

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS ESTEREOLÓGICAS NO *GRADING*
CITOLÓGICO DE MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS: UM PASSO
PARA A (IN)DIFERENCIAÇÃO?**

Joana Maria Fins Marques

Orientador

Prof. Doutor Ricardo Jorge Pereira Córdova Marcos

Co-orientadora

Prof. Doutora Marta Susana Amaro dos Santos

Porto 2017

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS ESTEREOLÓGICAS NO *GRADING*
CITOLÓGICO DE MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS: UM PASSO
PARA A (IN)DIFERENCIAÇÃO?**

Joana Maria Fins Marques

Orientador

Prof. Doutor Ricardo Jorge Pereira Córdova Marcos

Co-orientadora

Prof. Doutora Marta Susana Amaro dos Santos

Porto 2017

Resumo

O presente relatório reflete o trabalho desenvolvido nos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS-UP, onde realizei o estágio curricular de conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Ao longo de 16 semanas acompanhei a rotina diagnóstica dos Serviços de Citologia Veterinária, desde a receção das amostras, passando pelo seu registo, processamento e terminando com a observação ao microscópio, sempre acompanhada da discussão dos casos e emissão do diagnóstico. Paralelamente foi desenvolvido um trabalho de investigação sobre mastocitomas cutâneos caninos, que incluiu a utilização de ferramentas estereológicas para o *grading* citológico destes tumores — tendo sido este o principal tema deste estágio.

Os mastocitomas são os tumores cutâneos mais frequentes no cão e ainda há um longo caminho a percorrer no que diz respeito ao estabelecimento do prognóstico e seleção do tratamento destas neoplasias. Numa primeira fase do trabalho, realizou-se um ensaio preliminar com o intuito de otimizar estratégias de quantificação da área nuclear dos mastócitos e afinar protocolos de colorações para o estudo principal. Neste, foram selecionados retrospectivamente 51 casos de mastocitomas do arquivo dos Serviços de Citologia Veterinária. Para cada caso foi estabelecido o grau citológico, segundo um sistema recente de classificação, e avaliada a reprodutibilidade interobservador. As áreas dos núcleos das células neoplásicas foram avaliadas num software de estereologia (CAST-Grid), usando uma ferramenta designada 2D-nucleator. As áreas nucleares médias obtidas em citologia foram depois comparadas com o grau histopatológico, tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os graus. Foram também determinados *cutoffs* com potencial utilidade clínica. Estes resultados são promissores quanto à utilização de ferramentas estereológicas em citologia. Estas ferramentas geram dados mais objetivos e reprodutíveis, podendo contribuir para uma avaliação mais completa dos mastocitomas, auxiliando na seleção do plano terapêutico e/ou cirúrgico ao animal, após diagnóstico citológico de mastocitoma cutâneo. Este trabalho constituiu um primeiro passo, a que se deverão suceder outros, que visem avaliar o valor prognóstico dos dados quantitativos, sendo para tal necessário dados de *follow-up* e estudos de sobrevivência dos animais.

Agradecimentos

Aos meus pais, porque sem eles não tinha chegado até aqui, e o que sou hoje a eles lhes devo!

À família e aos amigos, à D. Arminda e ao Sr. Saraiva, à D. Aninhas e à Laurinha por tudo o que representam para mim, por todo o apoio e incentivo, pela sua presença visível ou invisível nos momentos mais importantes da minha vida.

Ao meu orientador, Professor Doutor Ricardo Marcos, pela disponibilidade, desde a primeira hora, por todo o tempo que dedicou a este trabalho, pela tranquilidade que sempre me transmitiu e por me incentivar a fazer mais e melhor.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Marta Santos, pela preocupação, pelo apoio que sempre me prestou, por todos os conhecimentos que me transmitiu e pelo gosto inspirador que demonstra por aquilo que faz.

Ao Departamento de Microscopia e ao Laboratório de Histologia e Embriologia do ICBAS, pelo acolhimento e, muito especialmente, às técnicas Fernanda Malhão e Célia Lopes pela simpatia, pela hospitalidade, pelo contributo precioso para este trabalho, por me fazerem sentir em casa durante as dezasseis semanas de estágio.

À Professora Doutora Patrícia Dias-Pereira, pela disponibilidade e amabilidade, por todo o apoio na revisão dos casos com histopatologia.

À Doutora Carla Correia-Gomes, pelo apoio e participação no estudo de reprodutibilidade.

Ao ICBAS, aos Professores do MIMV, a toda a comunidade icbasiana em geral, porque de uma ou outra forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

À FCUP, aos amigos que fiz em Bioquímica, pelo primeiro ano de integração na UP, porque bem vistas as coisas foi aí que nasceu o gosto pela Citologia!

À “turma mais fixolas”, à Inês Gomes, à Rita, à Maruco, à Cátia, à Alice, à Cristiana, à Filipa, à Inês Rei, à Xana, ao Luis, à Mariana, por TUDO, por seis anos de convívio, de companheirismo, de trabalho árduo, mas também de aventuras e desventuras e de momentos muito felizes que levo comigo para a vida!

À minha segunda casa, à comunidade paroquial de São Romão de Vermoim, aos meus amigos e grupos, por tudo o que me dão, por contribuírem muito para aquilo que sou hoje, porque apesar de toda a correria vale a pena tentar mudar o pequeno mundo que está à nossa volta!

A Ti, pelo dom da vida, pelas graças que me dás e por nunca me abandonares!

À Nucha, ao Rex e à MEL, por me mostrarem a beleza desta profissão! Dás-me (deram-me) muito mais do que eu algum dia poderei retribuir. Mas prometo que vou dar o meu melhor!

***“A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana”
(Charles Darwin)***

Lista de abreviaturas

AUC	<i>Area Under the Curve</i>
CE	Coeficiente de Erro
cga	campo de grande ampliação
CV	Coeficiente de Variação
H&E	Hematoxilina e Eosina
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>

Índice geral

Resumo	iii
Agradecimentos	iv
Lista de abreviaturas.....	v
Índice geral	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Mastocitomas em cães: caracterização	1
1.2 Mastocitomas em cães: diagnóstico	2
1.2.1 Diagnóstico histopatológico e o sistema de grau	2
1.2.2 Diagnóstico citológico e o sistema de grau	5
1.3 Mastocitomas em cães: quantificação	8
2. OBJETIVOS	8
3. ENSAIO PRELIMINAR	9
3.1 Avaliação de diferentes protocolos de recoloração dos mastocitomas	10
3.2 Medição da área nuclear média antes e após recoloração com H&E	10
3.3 Estratégias de medição da área nuclear dos mastócitos	10
3.3.1 2D-nucleator	10
3.3.2 Pontos	11
3.3.3 Image J.....	11
3.4 Resultados	12
3.5 Conclusões.....	14
4. ESTUDO: ABORDAGEM QUANTITATIVA AOS MASTOCITOMAS EM CÃES	15
4.1 Material e métodos	15
4.1.1 Seleção de casos.....	15
4.1.2 Atribuição do grau citológico segundo Camus et al.....	16
4.1.3 Recoloração com H&E.....	16
4.1.4 Determinação da área nuclear dos mastócitos com o 2D-nucleator.....	17
4.1.5 Revisão do grau histopatológico	18
4.2 Resultados	19
4.3 Conclusões.....	23
5. PERSPETIVAS FUTURAS.....	27
6. BIBLIOGRAFIA	28
ANEXO I	31
ANEXO II	32
ANEXO III.....	35

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mastocitomas em cães: caracterização

Os mastocitomas cutâneos caninos são neoplasias de células redondas, descritas pela primeira vez há 75 anos¹. Estas neoplasias caracterizam-se pela presença de uma população predominante de mastócitos mais ou menos diferenciados, isto é, podendo exibir variável granulação citoplasmática e atipia nuclear. Desde a sua primeira descrição, esta neoplasia foi considerada como potencialmente maligna, devido ao seu comportamento biológico imprevisível com risco de disseminação generalizada¹⁻⁴.

A prevalência dos mastocitomas cutâneos na população canina ultrapassa os 0,27%, sendo uma das neoplasias mais comuns nesta espécie. É o tumor cutâneo mais frequente, representando mais de 21% de todas as neoplasias cutâneas caninas^{5,6}. Os mastocitomas aparecem tipicamente em cães de meia-idade, por volta dos 8-9 anos (no momento do diagnóstico), mas podem surgir em qualquer fase da vida^{2,7}, havendo descrição de casos em animais muito jovens (menos de 2 meses)^{8,9}. A predisposição relativa ao género não tem sido reportada, mas existem raças mais suscetíveis, nomeadamente: Boxer, Boston Terrier, Bulldog Inglês, Pug, Labrador Retriever, Golden Retriever, Cocker Spaniel, Schnauzers, Staffordshire Terriers, Beagle, Leão da Rodésia, Weimaraner, Shar Pei^{3,6-7} e Bull Terrier⁶. Apesar de não se conhecer a etiopatogenia dos mastocitomas, têm sido apontados fatores de risco genéticos devido, por um lado, ao aumento da incidência em determinadas raças e, por outro, à existência de mutações no recetor c-Kit, responsáveis pela desregulação da sinalização celular⁷.

Do ponto de vista clínico, os animais com mastocitomas apresentam geralmente um nódulo único na pele, mas cerca de 10%-15% dos cães podem surgir com múltiplas lesões⁷. Os mastocitomas podem ocorrer como doença neoplásica primária ou metastática, podendo manifestar-se em qualquer região anatômica². Ainda assim, os mastocitomas são mais frequentes no tronco e região perineal, seguindo-se as extremidades e a cabeça e pescoço, com percentagens de, aproximadamente, 50%, 40% e 10%, respetivamente⁷. O diagnóstico macroscópico é difícil, dada a variabilidade morfológica que este tumor pode exibir. Pela capacidade de mimetizar outras neoplasias, e mesmo processos não neoplásicos, os mastocitomas são considerados os “grandes imitadores”^{6,7}. Contudo, existem alguns dados da história clínica e certos sinais clínicos, que podem levar o médico veterinário a suspeitar de mastocitomas, tais como: 1) crescimento rápido do nódulo; 2) variação de tamanho do nódulo num curto espaço de tempo; 3) prurido local; 4) auto-mordedura; 5) ocorrência de vômitos; (6) aparecimento de eritema e formação de pápulas. Esta última característica é por vezes

designada como “sinal de Darier” e deve-se à desgranulação dos mastócitos que pode ocorrer, inclusivamente, na sequência da recolha de uma amostra citológica⁷.

A punção com agulha fina do nódulo cutâneo constitui a primeira abordagem diagnóstica nos mastocitomas. O exame citológico é muito vantajoso: é célere, pouco invasivo, económico e tem elevada concordância (cerca de 94%) com o diagnóstico histopatológico^{3-4,7,10}. É relativamente fácil diagnosticar um mastocitoma em citologia e, regra geral, a imagem microscópica obtida não suscita muitas dúvidas. As principais dificuldades residem na classificação citológica dos tumores em bem diferenciado, moderadamente ou pouco diferenciado. Estes últimos, quando completamente desprovidos de grânulos, podem tornar-se um verdadeiro desafio diagnóstico.

Presentemente, o exame histopatológico continua a ser o que permite a correta determinação do grau histológico do tumor, já que avalia a dispersão celular e a presença de mastócitos nas margens do tecido removido⁴. É também este exame que apresenta maior valor prognóstico¹¹. Ainda assim, reúne algumas desvantagens: é mais caro, invasivo e é realizado após a cirurgia. Os resultados do exame histopatológico podem levar a uma alteração do planeamento médico e cirúrgico previamente estabelecido implicando, por vezes, a realização de nova cirurgia ou a alteração do protocolo de quimioterapia.

Os mastocitomas são benignos e solitários na maioria dos casos; todavia, há tumores localmente invasivos que podem progredir para doença metastática fatal. O tratamento deste tipo de neoplasias passa pela excisão cirúrgica com amplas margens de segurança e, se necessário, quimioterapia e terapêutica de suporte. Algumas neoplasias de comportamento biológico mais agressivo têm origem no períneo, escroto, prepúcio e dígitos^{4-5,10}. Assim, o prognóstico dos mastocitomas deve resultar da combinação e avaliação de diversos parâmetros: grau histológico do tumor (que é o mais relevante, como referido anteriormente); margens cirúrgicas; localização e dimensões dos mastocitomas; taxa de crescimento tumoral; testes moleculares; estadió clínico; sinais clínicos e síndromes paraneoplásicas (consequentes à desgranulação dos mastócitos)^{2,10}.

1.2 Mastocitomas em cães: diagnóstico

1.2.1 Diagnóstico histopatológico e o sistema de grau

O grau histológico fornece informações primordiais acerca do comportamento biológico dos mastocitomas, sendo a principal ferramenta utilizada pelos clínicos para a decisão terapêutica e o fator de prognóstico mais relevante nestas neoplasias¹¹.

Historicamente, foram propostos 4 sistemas para atribuição do grau nos últimos 40 anos: o de Hottendorf e Nielsen¹², o de Bostock¹³, o de Patnaik et al¹⁴ e, por último, o de Kiupel et al¹¹.

Até 2011, o sistema mais usado para a atribuição do grau histológico era o de Patnaik et al¹⁴ que considerava 3 graus: graus I, II e III que correspondia aos tumores bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados, respetivamente. Esta classificação considera cinco critérios: (1) celularidade; (2) morfologia celular; (3) índice mitótico; (4) invasão tecidular; (5) reação do estroma. Na Tabela 1 são apresentados os três graus histológicos, elencando-se as principais características definidas por Patnaik et al¹⁴.

Tabela 1. Sistema de grau histológico de Patnaik et al¹⁴; (*) figuras de mitose por campo de grande ampliação.

	Celularidade	Morfologia Celular	Índice Mitótico*	Invasão Tecidular	Reação do Estroma
Grau I	Baixa	<ul style="list-style-type: none"> - Mastócitos bem diferenciados dispostos em filas ou grupos - Grânulos de tamanho médio - Núcleos redondos 	0	<ul style="list-style-type: none"> - Derme e espaços interfoliculares 	Mínima
Grau II	Moderada a elevada	<ul style="list-style-type: none"> - Pleomorfismo moderado - Citoplasma finamente granular - Núcleos redondos ou com chanfraduras 	0-2	<ul style="list-style-type: none"> - Derme profunda - Tecido subcutâneo 	Eventualmente: <ul style="list-style-type: none"> - Edema - Necrose - Colagenólise
Grau III	Elevada	<ul style="list-style-type: none"> - Mastócitos pleomórficos - Núcleos com formas não redondas: com chanfraduras ou vesiculados - Nucléolos proeminentes 	3-6	<ul style="list-style-type: none"> - Arranjos em “toalha” substituem tecido subcutâneo e adjacente 	<ul style="list-style-type: none"> - Hemorragia - Edema - Necrose - Colagenólise

Os mastocitomas de grau I, normalmente, têm um excelente prognóstico e a excisão cirúrgica completa é um tratamento definitivo. Por outro lado, os mastocitomas de grau III, em princípio com comportamento biológico mais agressivo, apresentam pior prognóstico, com maior probabilidade de recorrência local, risco de invasão e metastização à distância. Nestes casos será necessária quimioterapia adjuvante além da cirurgia. Relativamente aos tumores de grau II, o seu comportamento é o menos previsível. A maioria comporta-se como grau I, ainda que 5 a 22% dos tumores possam metastizar¹⁵. Comparativamente com os tumores de graus I e II, os de grau III parecem associar-se a uma menor sobrevivência. Segundo Patnaik et al¹⁴, 93%, 44% e 6% dos cães com tumores bem diferenciados, moderadamente e pouco diferenciados, respetivamente, sobrevivem além dos 1500 dias do período de *follow-up*. Todavia, estudos mais recentes referem que não há diferenças estatisticamente significativas entre os graus I e II em termos de sobrevivência^{11,16}.

Apesar do valor prognóstico do grau histológico ser amplamente reconhecido, foram sendo reportadas algumas deficiências do sistema de Patnaik. A ambiguidade da categoria intermédia, onde são englobados cerca de 50% dos mastocitomas, foi uma das primeiras críticas. Há certa

tendência em classificar como grau II todos aqueles tumores que estão no limite das restantes duas categorias¹⁶. Este grau oferece pouca informação prognóstica ao clínico, uma vez que o animal tem aproximadamente a mesma probabilidade de sobrevivência/morte para um determinado período de tempo após o diagnóstico. Um outro aspeto prende-se com a variabilidade interobservador, que torna este sistema menos reprodutível¹⁶. Por fim, os critérios aplicados na atribuição de grau [por exemplo, a obrigatoriedade da presença de 3-6 figuras de mitose por campo de grande ampliação (cga)] nos tumores de grau III podem excluir deste grupo alguns mastocitomas de comportamento potencialmente mais agressivo. Mesmo tumores de grau I, considerados mais inofensivos, podem disseminar-se; este aspeto não se restringe aos de grau mais elevado^{10,11}.

No sentido de colmatar estas falhas, Kiupel et al¹¹ propõem um novo sistema de grau histológico, baseado em parâmetros mais objetivos. Este privilegia as características nucleares das células neoplásicas, dividindo os tumores em duas categorias: baixo grau e alto grau. Os propósitos de Kiupel et al¹¹ eram, por um lado, aumentar a concordância interobservador, tornando o sistema de grau histológico mais reprodutível entre os patologistas e, por outro lado, eliminar a ambiguidade inerente ao predomínio dos tumores de grau II. Dessa forma, este sistema aumentava o valor prognóstico e a utilidade clínica do grau histológico dos mastocitomas¹¹.

Segundo o sistema de Kiupel et al¹¹, um mastocitoma é classificado em alto grau quando apresenta qualquer um dos seguintes parâmetros: (1) sete ou mais figuras de mitose em 10 cga; (2) três ou mais células multinucleadas (com 3 ou mais núcleos) em 10 cga; (3) três ou mais núcleos bizarros em 10 cga; (4) cariomegalia — que se traduz na existência de núcleos cujo diâmetro é, pelo menos, duas vezes superior ao de outros núcleos — em 10% ou mais das células neoplásicas. Contrariamente, para um tumor ser considerado de baixo grau não pode exibir nenhuma das características anteriores¹¹.

O estudo de Kiupel et al¹¹ mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os tumores de baixo e alto grau, relativamente ao menor tempo de sobrevivência e de aparecimento de metástases e recidivas. De facto, o tempo médio de sobrevivência era inferior a quatro meses para os mastocitomas de alto grau, mas superior a dois anos para os mastocitomas de baixo grau. Para além disso, cerca de 90% dos cães com mastocitomas de alto grau morriam devido a doença associada e 70% desenvolviam metástases. Por oposição, apenas 5% dos cães com mastocitomas de baixo grau morreram devido a doença associada e as metástases desenvolveram-se em 20%¹¹.

Numa comparação entre os dois sistemas de grau, todos os tumores de grau I de Patnaik foram classificados como baixo grau de Kiupel, assim como todos os de grau III de Patnaik foram classificados como alto grau de Kiupel¹⁶. Além disso, foi verificado que 86% dos mastocitomas

de grau II de Patnaik eram de baixo grau de Kiupel, enquanto os restantes 14% de grau II de Patnaik eram de alto grau de Kiupel¹⁶. Estes dois grupos apresentavam diferenças estatisticamente significativas relativamente à probabilidade de sobrevivência ao ano (após o diagnóstico). Neste mesmo estudo discutiu-se a vantagem do uso combinado dos dois sistemas, Patnaik e Kiupel. Esta combinação ajudaria na destrição entre os mastocitomas de grau II de melhor prognóstico e os de grau II com comportamento biológico mais agressivo¹⁶.

O novo sistema de grau proposto por Kiupel et al¹¹ contribuiu para a melhoria da concordância interobservador, fixada nos 97%, e para a identificação dos cães que necessitavam de outros tratamentos, para além da cirurgia. Ademais, tem sido demonstrado que o grau histológico segundo Kiupel et al¹¹ se correlaciona, significativamente, com a sobrevivência, a mortalidade e o risco de metastização. Com este sistema, reconhecem-se com maior consistência e menor ambiguidade os tumores biologicamente mais agressivos⁵. Assim, o sistema mais usado atualmente na determinação do grau histológico dos mastocitomas é o de Kiupel et al¹¹, uma vez que demonstrou ser mais vantajoso que o modelo de Patnaik et al¹⁴, vigente até então^{5,16}.

1.2.2 Diagnóstico citológico e o sistema de grau

Os mastocitomas estão incluídos na categoria das neoplasias de células redondas, caracterizando-se pela presença de células neoplásicas arredondadas e isoladas (habitualmente separadas umas das outras). Ao contrário dos tumores de células epiteliais, os mastócitos não possuem junções intercelulares pelo que aparecem individualizados. Já no que se refere à forma redonda, apesar de característica destes tumores, existem outros processos neoplásicos associados à presença de células redondas².

Os mastocitomas identificam-se pela presença de uma população de células com limites celulares definidos e com grânulos intracitoplasmáticos de cor violeta a púrpura, cujo tamanho varia de fino a mais grosseiro. Esta é uma das particularidades deste tumor que, quando presente, ajuda no diagnóstico citológico definitivo². Os núcleos dos mastócitos assumem uma posição central a paracêntrica e a sua forma varia de redonda a ovoide. O seu tamanho corresponde a 2 a 4 vezes o diâmetro dum eritrócito. A cromatina apresenta um padrão finamente pontilhado e uniforme, mas pode aparecer mais condensada, com padrões mais irregulares nos tumores menos diferenciados. Contudo, a avaliação dos detalhes nucleares nem sempre é fácil: em mastocitomas muito granulares, os grânulos podem cobrir parcial ou totalmente o núcleo; por outro lado, o núcleo também pode aparecer pouco corado, como resultado da elevada afinidade dos grânulos pela coloração utilizada².

Geralmente, as amostras citológicas dos mastocitomas apresentam boa celularidade, podendo exibir alguma contaminação hemática. Em pano de fundo podem encontrar-se grânulos

de cor violeta a púrpura, provenientes de células neoplásicas que roturaram aquando da realização do esfregaço. Surgem também eosinófilos, cuja presença não parece ter significado prognóstico^{2,4,10}. Nas amostras de mastocitomas é ainda possível encontrar fibroblastos reativos. Estes são fusiformes a poligonais, por vezes de grandes dimensões e com citoplasma claro a intensamente azul. O núcleo, volumoso e ovoide, dispõe-se centralmente, apresentando um padrão de cromatina uniforme e, eventualmente, nucléolo proeminente².

A classificação citológica dos mastocitomas está relacionada com o nível de granulação dos mastócitos e com a atipia nuclear. Inicialmente, a classificação em citologia teve por base o sistema histológico de Patnaik et al¹⁴, apoiando-se no facto de existir grande correlação entre o aspeto citológico e histológico destas células^{2,10}. Assim, os mastócitos exibem numerosos grânulos intracitoplasmáticos e baixo pleomorfismo, com núcleos pequenos e uniformes, nos tumores bem diferenciados. Já nos tumores moderadamente diferenciados, o número de grânulos é menor e os núcleos podem variar no tamanho e forma. Finalmente, nos tumores pouco diferenciados, os limites celulares aparecem mal definidos e os grânulos estão ausentes ou são escassos. Nestes, há anisocariose e os núcleos demonstram marcada atipia, com padrões de cromatina grosseira. Os tumores pouco diferenciados podem apresentar nucléolos proeminentes e múltiplos, podendo encontrar-se figuras de mitose. As células bizarras, gigantes ou binucleadas são mais frequentes nestes tumores^{4,10}.

No que diz respeito ao prognóstico definido em termos citológicos, os mastocitomas bem diferenciados são considerados como tumores praticamente benignos, enquanto os pouco diferenciados são de prognóstico reservado. Desta forma, a malignidade tende a ser proporcional ao nível de indiferenciação das células neoplásicas, sendo tanto maior quanto menor for a quantidade de grânulos e maior for a atipia celular e nuclear dos mastócitos⁴.

Mais recentemente, o sistema de grau histológico de Kiupel et al¹¹ serviu de base para um novo sistema de grau aplicado à citologia, proposto por Camus et al¹⁵. Este sistema considera que as amostras citológicas de mastocitomas podem gerar as mesmas informações do sistema de Kiupel et al¹¹, mas de forma mais rápida, económica e minimamente invasiva. Estes autores destacaram a utilidade de um sistema de grau citológico para o planeamento médico e cirúrgico, assim como o valor prognóstico da informação do grau, antes mesmo da cirurgia¹⁵. Segundo o grau citológico de Camus et al¹⁵, os mastocitomas são classificados quanto a: (1) granulação, que pode ser escassa, mista (coexistência de mastócitos bem granulados e pouco granulados) ou elevada; (2) pleomorfismo nuclear, que se considera presente se os núcleos dos mastócitos exibirem formas não redondas *versus* ausente se as formas nucleares variarem de redondas a ovoides; (3) figuras de mitose; (4) células binucleadas ou multinucleadas; (5) anisocariose, que se considera presente se houver mais de 50% de variação no tamanho nuclear das células neoplásicas. Na Figura 1 está representado o algoritmo usado na aplicação dos critérios do grau

citológico, em que está bem patente a grande valorização da granulação dos mastócitos. De facto, basta que os mastócitos apresentem um número escasso de grânulos intracitoplasmáticos para que o mastocitoma seja classificado em alto grau¹⁵.

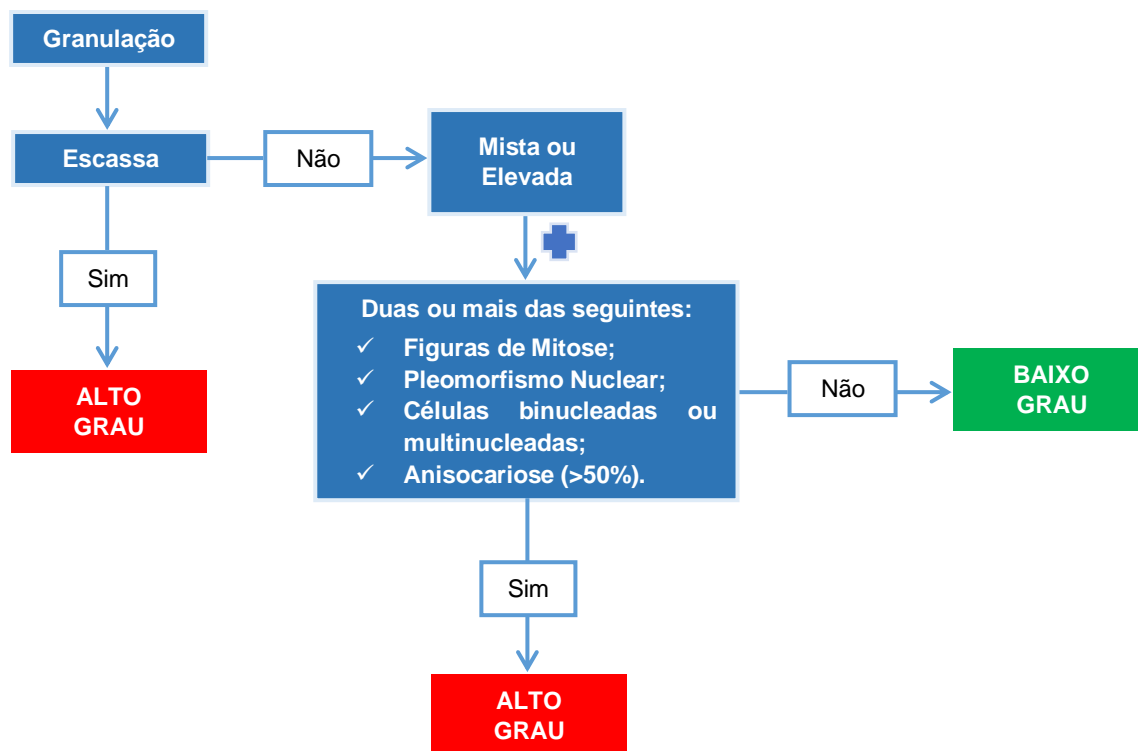


Figura 1. Algoritmo para a aplicação do sistema de grau citológico de Camus et al¹⁵.

Segundo Camus et al¹⁵, a percentagem de tumores de alto grau em citologia foi superior à da histopatologia, sendo esta uma das desvantagens do grau citológico. Com este grau poderão existir falsos positivos (cerca de 5%)¹⁵. De todos os critérios, o pleomorfismo nuclear é o que menos se correlaciona com a sobrevivência, assim como a presença de fibras de colagénio, também avaliado nesse trabalho. Foi também demonstrado que os mastocitomas de alto grau citológico estão mais frequentemente associados ao desenvolvimento de tumores secundários ou à recorrência do tumor primário. Já os mastocitomas de baixo grau citológico associam-se a períodos de sobrevivência mais longos e a probabilidade de serem classificados, posteriormente, como alto grau na histopatologia é reduzida¹⁵. Assim, o grau citológico apresenta grande utilidade, até porque a concordância interobservador com este sistema foi considerada superior à do grau histopatológico¹⁵.

Através deste novo sistema de grau, Camus et al¹⁵ provaram a existência de valor prognóstico na citologia, quer em relação ao comportamento biológico dos mastocitomas, quer à sobrevivência. No entanto, este não foi o único trabalho sobre a aplicação em citologia de sistemas de grau. Com efeito, Scarpa et al¹⁷ e Hergt et al¹⁸ aplicaram o sistema proposto por Kiupel em 50 e 141 casos de mastocitomas, respetivamente. Estes autores obtiveram uma

sensibilidade de 85-86% e uma especificidade de 97% para a classificação em baixo e alto grau em citologia^{17,18}. Assim, o grau citológico pode ajudar o clínico a delinear precocemente o plano terapêutico e cirúrgico do animal¹⁵.

1.3 Mastocitomas em cães: quantificação

Ao longo dos últimos 15 anos, têm sido realizados alguns estudos com o intuito de objetivar os parâmetros de classificação dos mastocitomas¹⁹⁻²¹. A morfometria computadorizada, já enraizada na Medicina Humana e de uso crescente na Medicina Veterinária²², é um método que permite obter dados quantitativos, eventualmente usados como indicadores de prognóstico. As grandes vantagens prendem-se com a elevada reprodutibilidade, baixo risco de viés associada ao observador e a deteção de diferenças subtis, que escapariam à capacidade discriminativa da visão humana²². Nos mastocitomas, Strefezzi et al¹⁹ foram pioneiros na aplicação de morfometria nuclear em amostras citológicas, mostrando que existiam diferenças consoante o grau histopatológico. Curiosamente, os dados citológicos então obtidos já pareciam indiciar a presença de dois graus histopatológicos, uma vez que não existiam diferenças entre os graus I e II de Patnaik¹⁹. Esses dados foram depois corroborados por morfometria aplicada em histopatologia²⁰ e novamente em amostras citológicas²¹. Entretanto, um outro estudo encetado por Strefezzi et al³ revelou que a morfometria podia aumentar o valor diagnóstico da citologia, ao fornecer parâmetros numéricos mais objetivos. Foi também mostrada uma correlação inversa entre a área nuclear média dos mastócitos e a sobrevivência do animal (ou seja, tempos de sobrevivência mais curtos estavam significativamente relacionados com áreas nucleares maiores)³. Mais recentemente, estes autores mostraram que existia uma elevada reprodutibilidade intra- e interobservador na avaliação morfométrica da área e do perímetro nuclear dos mastócitos⁶. Assim, a morfometria nuclear poderá ser um bom indicador de prognóstico dos mastocitomas, sendo obtido através de uma técnica rápida, económica e pouco invasiva, como é a citologia, e com a vantagem de ser reprodutível. A morfometria aplicada em citologia tem a vantagem adicional de evitar as variações do tamanho do núcleo inerentes ao processamento histológico²²; todavia, a delimitação manual do contorno dos núcleos, que é um processo demorado e tedioso, pode ser considerada uma desvantagem da morfometria^{19,21}.

2. OBJETIVOS

Há um longo caminho a percorrer no que diz respeito ao estadiamento precoce desta neoplasia, assim como na definição do prognóstico e estratificação do tratamento. O grau histopatológico continua a ser a pedra basilar para o prognóstico deste tipo de tumores. Contudo,

há inegáveis vantagens em usar a citologia, como método mais simples, prático e acessível, para agilizar o planejamento médico e cirúrgico, que inevitavelmente se seguem ao diagnóstico de mastocitoma. Nesse sentido, a aplicação dum sistema de grau citológico parece muito útil. Os sistemas de grau existentes baseiam-se na granulação e em critérios nucleares. Para que um qualquer grau seja amplamente usado, ele deve ser o mais possível reprodutível e objetivo. O uso de ferramentas quantitativas que permitam medir os núcleos dos mastócitos e calcular áreas nucleares, pode constituir um passo importante no sentido de aumentar a objetividade da avaliação citológica e aumentar o valor preditivo da informação recolhida através dessa amostra.

Assim sendo, os objetivos deste trabalho consistiram na: (1) otimização do método de quantificação da área do núcleo dos mastócitos em amostras citológicas; (2) avaliação da reprodutibilidade interobservador do grau citológico recentemente proposto¹⁵; (3) avaliação da capacidade discriminativa de observadores relativamente à anisocariose, um dos parâmetros nucleares constantes no grau citológico; (4) estudo da relação entre as diferentes áreas nucleares e os mastocitomas de baixo e alto grau histopatológico de Kiupel.

O presente trabalho encontra-se dividido em duas partes, um ensaio preliminar, onde foi otimizada a metodologia, e o estudo quantitativo propriamente dito. Para cada um deles estão definidos os objetivos, material e métodos, resultados e conclusões.

3. ENSAIO PRELIMINAR

Um dos objetivos do presente trabalho foi a otimização do método de quantificação da área nuclear dos mastócitos em amostras citológicas. Para essa medição, era fundamental que os limites dos núcleos estivessem claramente visíveis. Acontece que a presença de grânulos de cor violeta a púrpura no citoplasma dos mastócitos pode ser um entrave à perceção dos limites do núcleo. Assim, tornava-se essencial recorrer as lâminas com uma coloração que desse maior contraste nuclear e corasse significativamente menos os grânulos dos mastócitos.

Para esta otimização, foram escolhidas 7 amostras citológicas de 7 casos diferentes, que estavam coradas com Diff-Quik™. Numa primeira fase foram testadas as seguintes recolorações: (1) azul de toluidina; (2) Hematoxilina-Eosina (H&E) (Hematoxilina de Mayer); (3) H&E (Hematoxilina de Gill).

Para garantir que o processo de recoloração não alterava a área nuclear, foi feita uma comparação entre as áreas nucleares medidas em amostras coradas com Diff-Quik™ e as áreas nucleares desses mesmos casos após recoloração com H&E.

Depois de otimizada a recoloração, foram comparadas diferentes estratégias de medição da área nuclear, usando o contorno nuclear manual com um software de análise de imagem [Image J (<https://imagej.net>)] e usando duas ferramentas estereológicas para determinação de áreas, o

2D-nucleator e a grelha de pontos. Estes dois métodos foram aplicados usando um software de estereologia CAST-Grid v. 1.60 (Olympus, Dinamarca).

Resumidamente, o ensaio preliminar teve três grandes propósitos: (1) avaliar diferentes protocolos de recoloração dos mastocitomas que permitissem a melhor visualização dos limites nucleares dos mastócitos; (2) comparar vários métodos de medição da área nuclear, a fim de otimizar o processo de quantificação para o estudo principal; (3) comparar as áreas nucleares em Diff-Quik™ e após recoloração, no sentido de confirmar que não eram introduzidos vieses devidos à metodologia empregue.

3.1 Avaliação de diferentes protocolos de recoloração dos mastocitomas

Foram avaliadas a coloração de H&E, com Hematoxilina de Mayer e Gill e a coloração de azul de Toluidina (ver anexo I). Em ambos os casos, as colorações foram aplicadas diretamente sobre os esfregaços previamente corados com Diff-Quik™ e após descoloração, usando protocolo previamente publicado.²³

3.2 Medição da área nuclear média antes e após a recoloração com H&E

Para averiguar se a recoloração com H&E alterava a área nuclear média, foram usados 7 casos de mastocitomas. Foi primeiramente determinada a área nuclear média nas amostras citológicas previamente coradas com Diff-Quik™ através do 2D-nucleator (medindo cerca de 100 células por caso), como será detalhado mais à frente. Depois da recoloração com H&E, repetiu-se o procedimento de medição da área nuclear. No final, foram aplicados testes de normalidade (D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk's), comparando-se os valores antes e após a coloração (teste t de Student emparelhado). Foi usado o programa de estatística GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, San Diego, USA), considerando-se estatisticamente significativo um $p < 0,05$.

3.3 Estratégias de medição da área nuclear dos mastócitos

3.3.1 2D-nucleator

O 2D-nucleator é um método estereológico introduzido por Gundersen²⁴ que permite estimar a área nuclear média. O primeiro passo consiste na identificação do nucléolo ou, caso não seja observável, o centro do núcleo (no caso de existirem vários nucléolos, são realizadas várias medições e faz-se a média das várias estimativas produzidas). A partir desse ponto são geradas, de forma automática pelo software, duas linhas perpendiculares entre si, sendo que o operador

aponta no ecrã os quatro pontos de interseção com o limite nuclear (Figura 2A). A área do núcleo é estimada segundo a fórmula: $A = \pi l^2$, onde l representa o comprimento médio de cada linha gerada desde o nucléolo/centro do núcleo até ao limite nuclear.

Para o cálculo da área nuclear média através do 2D-nucleator foi usado um microscópio (Olympus BX50, Japão) equipado com uma câmara (Sony, Japão), um sistema de análise estereológica (CAST-Grid) e uma platina motorizada (Prior, Reino Unido). As medições foram feitas na objetiva de imersão, sendo os mastócitos observados no monitor (com uma ampliação final de 4050x). Para cada caso os cga foram selecionados de forma sistemática aleatória. Isto quer dizer que o primeiro campo foi determinado aleatoriamente pelo software e, a partir daí, a platina ia sendo deslocada numa direção constante, tendo particular cuidado para não repetir medições numa mesma partícula.

3.3.2 Pontos

A contagem de pontos é outra estratégia estereológica que pode ser usada para quantificar áreas. Este método assenta no princípio de que quando se colocam pontos sobre uma projeção de células (neste caso, mastócitos nos esfregaços) cada ponto “controla” uma área à sua volta. Assim, ao contarem-se os pontos, consegue-se uma estimativa da área²⁵ (Figura 2B). Esta estimativa será tanto mais precisa quanto maior for o número de pontos da grelha (ou seja, quanto menor for a área “controlada” por ponto). Neste caso foi usada uma grelha de 256 pontos que foi sobreposta no monitor através do software CAST-Grid, tendo sido analisados os mesmos campos avaliados pelo 2D-nucleator. Os pontos que se encontravam no interior do núcleo ou tocavam os seus limites foram contabilizados, sendo a área do núcleo estimada pela seguinte fórmula: $A = a(p).P$, onde $a(p)$ representa a área associada a cada ponto na grelha (neste caso $9,89 \mu\text{m}^2$) e P , o número de pontos contabilizados²².

3.3.3 Image J

O Image J é um sistema de análise de imagem gratuito que se encontra disponível na internet (<https://imagej.net>). Com este sistema, as amostras citológicas foram previamente fotografadas (nos mesmos campos avaliados com os dois métodos anteriores). O contorno nuclear foi definido pelo operador, em toda a sua extensão, e com o auxílio dum rato de computador³ (Figura 2C). Após calibrar a escala das imagens, o software fornece as áreas estimadas em μm^2 .

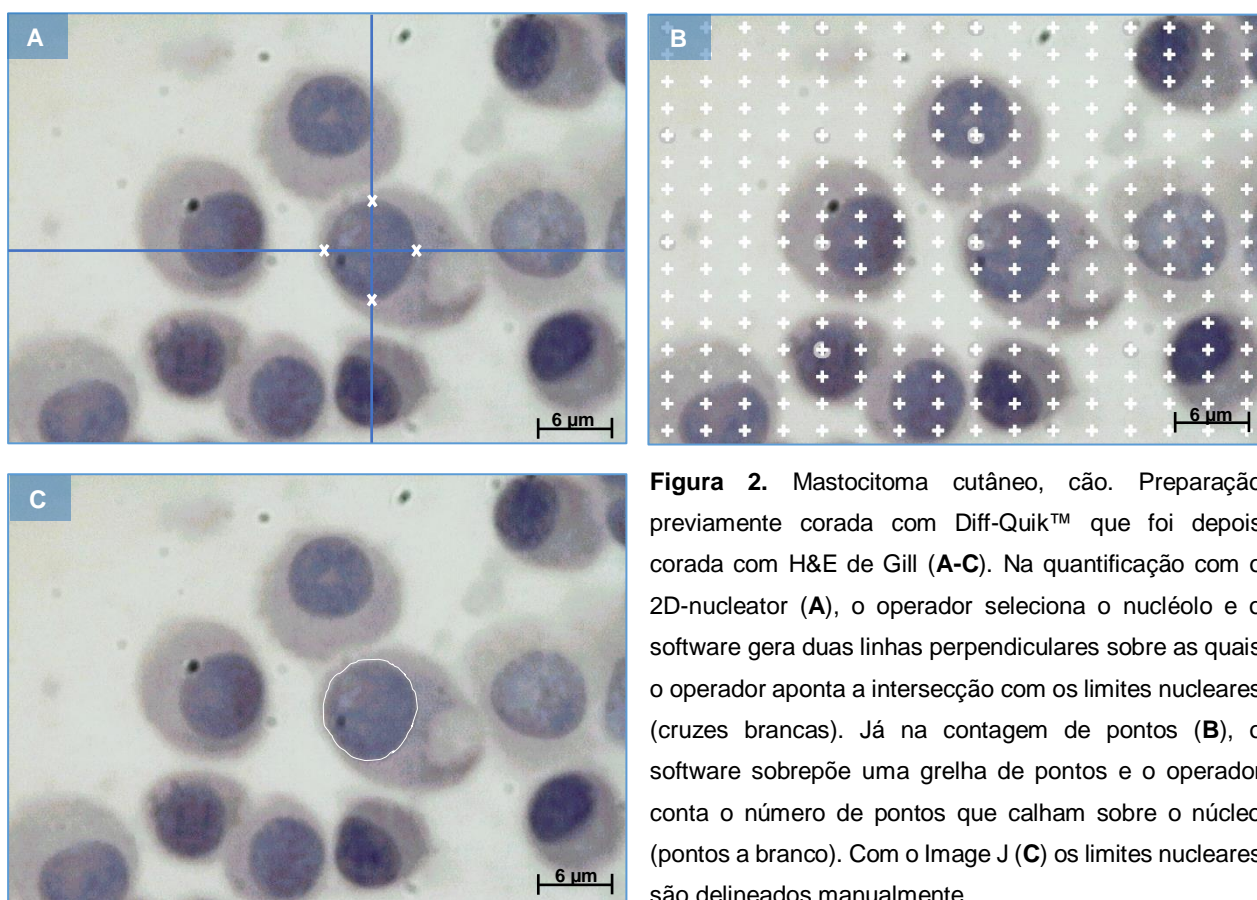


Figura 2. Mastocitoma cutâneo, cão. Preparação previamente corada com Diff-Quik™ que foi depois corada com H&E de Gill (A-C). Na quantificação com o 2D-nucleator (A), o operador seleciona o nucléolo e o software gera duas linhas perpendiculares sobre as quais o operador aponta a intersecção com os limites nucleares (cruzes brancas). Já na contagem de pontos (B), o software sobrepõe uma grelha de pontos e o operador conta o número de pontos que calham sobre o núcleo (pontos a branco). Com o Image J (C) os limites nucleares são delineados manualmente.

Neste ensaio preliminar, foram quantificados 7 mastocitomas, que tinham sido recorados com H&E, em que se empregaram os 3 métodos de estimativa de área nuclear (2D-nucleator, contagem de pontos e delimitação nuclear com análise de imagem). É importante referir que nestes casos foram medidas as mesmas células com os vários métodos e cerca de 100 núcleos por caso. De seguida, foram primeiro aplicados testes de normalidade (D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk's), seguidos de uma *one-way* ANOVA (amostra emparelhada) para comparar estas metodologias. Foi considerado estatisticamente significativo um $p < 0,05$.

3.4 Resultados

Na avaliação dos protocolos de recoloração, verificou-se que o azul de Toluidina ainda marcava os grânulos, pelo que por vezes era difícil perceber os limites nucleares. Já com a H&E o citoplasma aparecia menos corado. Ainda assim, com a Hematoxilina de Mayer ainda haviam alguns grânulos marcados, enquanto que com a de Gill estes não coravam.

Relativamente à descoloração prévia dos esfregaços corados com Diff-Quik™, verificou-se que esta era benéfica, uma vez que havia menor número de grânulos visíveis nas lâminas

descoloradas com uma solução de álcool-ácido. Entretanto, as características nucleares (incluindo o padrão de cromatina) não eram afetadas por este procedimento.

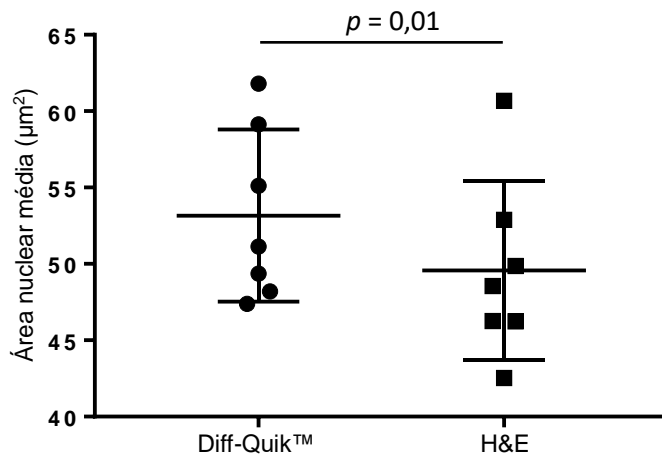


Figura 3. Comparação da área nuclear média dos mastócitos em Diff-Quik™ e após recoloração com H&E, com o 2D-nucleator; dados expressos em média \pm desvio padrão.

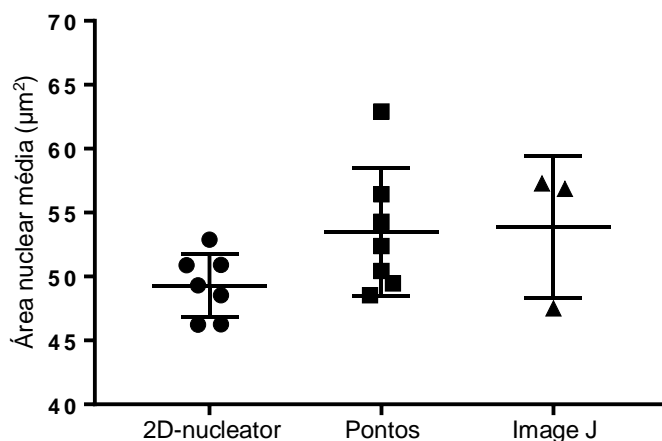


Figura 4. Estimativa da área nuclear média dos mastócitos em H&E usando diferentes estratégias de quantificação: 2D-nucleator, contagem de pontos e análise de imagem (Image J); dados expressos em média \pm desvio padrão.

Ao comparar os resultados da estimativa da área nuclear dos mastócitos, com recurso ao 2D-nucleator, em Diff-Quik™ e após recoloração com H&E das mesmas lâminas (Figura 3) verificou-se que existiam diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,01$) entre as duas colorações: a área nuclear em H&E era cerca de 7% menor. A coloração com H&E, ao não corar os grânulos dos mastócitos, permitiu avaliar melhor os detalhes nucleares, tais como forma e número. Algumas células multinucleadas só conseguiam ser identificadas como tal na coloração de H&E (o aglomerado de grânulos no Diff-Quik™ ocultava um dos núcleos). A questão dos

grânulos também era relevante para as próprias medições, uma vez que esses dificultavam a nítida percepção dos limites nucleares (o que é essencial na técnica do 2D-nucleator).

Já quanto às três estratégias de medição da área nuclear dos mastócitos, abordadas neste ensaio preliminar, a área nuclear média estimada foi semelhante entre a contagem por pontos e o contorno com o Image J, enquanto a área nuclear média obtida com o 2D-nucleator tendeu a ser ligeiramente inferior (Figura 4). No entanto, não existiam diferenças estatisticamente significativas entre os métodos. O coeficiente de erro (estimado por $CE = CV / \sqrt{n}$, em que n representa o número de medições) foi de 0,02, 0,04 e 0,06 para o 2D-nucleator, contagem de pontos e análise de imagem, respetivamente. Ainda assim, os métodos diferiam significativamente no tempo necessário para cada estimativa, uma vez que a contagem de pontos demorava cerca de 30 minutos por lâmina (com 100 células avaliadas), ao passo que o contorno com o software de análise de imagem era mais demorado (cerca de 90 minutos por lâmina). A estimativa com o 2D-nucleator demorava um tempo intermédio (cerca de 60 minutos por lâmina).

3.5 Conclusões

Para a avaliação sistemática dos núcleos de mastócitos e quantificação de parâmetros como a área nuclear, qualquer que seja o método utilizado, é fundamental que todos os núcleos e seus limites sejam observáveis. A coloração de Diff-Quik™ e, no geral, os corantes tipo Romanowsky caracterizam-se por proporcionarem um bom detalhe citoplasmático e por corarem os grânulos dos mastócitos, o que prejudica a observação do número e limites nucleares²⁶. Por isso, foi necessário proceder à recoloração das lâminas, tendo-se verificado que o Azul de Toluidina ainda comprometia a quantificação da área nuclear, enquanto a H&E (Hematoxilina de Gill) não a prejudicava. Estes aspetos foram concordantes com o trabalho de Graham et al²⁷, em que se avaliaram a coloração de mastócitos com 12 corantes (em macacos e porquinhos da Índia) e apenas a H&E (precisamente Hematoxilina de Gill) não marcou os grânulos.

Ainda no que respeita à coloração, verificou-se que esta influenciava a área nuclear, contrariamente ao que era esperado. Com a secagem ao ar, aquando da realização do esfregaço, e coloração com Diff-Quik™, as células ficam aderentes à lâmina e fixadas, pelo que as suas características deverão manter-se inalteradas após a recoloração com H&E. Contudo, perante os dados obtidos, não se pode excluir a possibilidade da H&E provocar o encolhimento dos mastócitos e dos seus núcleos.

Para otimizar o processo de quantificação da área nuclear, compararam-se três estratégias (2D-nucleator, contagem de pontos e Image J) que não mostraram diferenças estatisticamente significativas. Ainda assim, existiam diferenças significativas no tempo da análise. Apesar da

contagem de pontos ser globalmente mais rápida, a precisão desta técnica depende da grelha usada (nomeadamente do número de pontos) e é uma técnica menos sujeita à aleatoriedade — que é um aspeto fundamental da quantificação com técnicas estereológicas. Este método é uma boa alternativa por ser fácil de implementar, bastando sobrepor uma grelha de acetato sobre as imagens observadas num monitor plano. Contrariamente, o 2D-nucleator é uma técnica mais precisa²⁴ e foi escolhida por essa razão. Ainda assim, este método poderá ter algumas desvantagens, uma vez que exige um software específico e a identificação do nucléolo depende do operador. O contorno manual dos núcleos de mastócitos com ferramentas de análise de imagem já foi usado por diversos autores, quer em amostras citológicas^{3,6,19,21} quer em histopatologia²⁰. Já foi demonstrado que este método é reproduzível entre observadores e em cada observador ao longo do tempo⁶. No entanto, é um método mais demorado, metucioso e poderá ser menos preciso, visto que a delimitação do núcleo é feita manualmente com o rato de computador. Esta precisão será ainda menor se o núcleo se encontrar obscurecido por grânulos. Considerando todos esses elementos, selecionou-se o 2D-nucleator como método de quantificação para o estudo principal. Este método é preciso, tem menor probabilidade de introdução de viés e apresenta uma rapidez comportável no contexto dum trabalho de investigação.

4. ESTUDO: ABORDAGEM QUANTITATIVA AOS MASTOCITOMAS EM CÃES

4.1 Material e métodos

4.1.1 Seleção de casos

Foi realizado um estudo retrospectivo, tendo por base um conjunto de casos com diagnóstico citológico de mastocitoma cutâneo, nos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS. Do arquivo dos Serviços foi selecionada uma amostra consecutiva de mastocitomas cutâneos caninos, correspondente ao período de janeiro de 2012 a junho de 2016, constituída por 68 casos. Em animais com múltiplos nódulos no momento do diagnóstico (2 casos), considerou-se cada nódulo individualmente (correspondia a um caso). Todos os casos foram reavaliados citologicamente, usando como critérios de exclusão a má preservação das células e baixa celularidade (menos de 100 células preservadas). Nos casos com múltiplas lâminas, foi selecionada a mais representativa, isto é, com maior celularidade e melhor preservação (núcleos não roturados e dispostos em monocamada). Foram excluídos 17 casos, mantendo-se 51 para a fase seguinte.

4.1.2 Atribuição do grau citológico segundo Camus et al¹⁵

As 51 amostras citológicas de mastocitomas foram classificadas por 3 observadores (JM, MS, RM) para atribuição do grau citológico segundo Camus et al¹⁵. Os 5 primeiros casos foram avaliados pelos 3 observadores em simultâneo, num microscópio de múltiplas cabeças, para aferição dos critérios de classificação dos mastocitomas. Além dos parâmetros que sustentam o sistema de grau citológico (Figura 5), foi também aferida a percentagem de células neoplásicas com limites nucleares não visíveis devido à granulação. Os restantes 46 casos foram classificados, de forma independente, por cada um dos observadores, no sentido de avaliar a reprodutibilidade interobservador dos parâmetros do grau citológico. Como já referido, foram avaliados os seguintes parâmetros: (1) granulação (*escassa*, *mista* ou *elevada*); (2) pleomorfismo nuclear (*presente*, se os núcleos dos mastócitos exibiam formas não redondas e *ausente*, se as formas nucleares variavam de redondas a ovoides); (3) figuras de mitose (*presentes* ou *ausentes*); (4) células binucleadas e multinucleadas (*presentes* ou *ausentes*); (5) anisocariose (*presente* se havia mais de 50% de variação no tamanho nuclear dos mastócitos)¹⁵.

Os dados obtidos por cada um dos observadores na aplicação do sistema de grau citológico de Camus et al¹⁵ foram utilizados num estudo de reprodutibilidade interobservador (ver anexo II). A concordância interobservador foi analisada com recurso à estatística kappa (*unweighted, K_u* or *weighted, K_w*)²⁸ e ao coeficiente de correlação intraclasse (ICC)²⁹. Foi considerado estatisticamente significativo um $p < 0,05$.

4.1.3 Recoloração com H&E

As lâminas selecionadas do arquivo estavam coradas com Diff-Quik™, coloração usada por rotina para o diagnóstico citológico. Como referido anteriormente, as lâminas foram recoradas com H&E para melhorar a visualização dos detalhes nucleares dos mastócitos (Figura 6).

De acordo com o protocolo aferido no ensaio preliminar, as lâminas foram colocadas em xilol até ser removida a lamela (o que demorou 1 dia para as lâminas mais recentes, até 4 dias para as mais antigas). De seguida, foram submetidas a um processo de rehidratação, sendo colocadas em etanol absoluto (5 minutos), etanol a 70% (5 minutos) e passagem em água corrente (1 minuto). Posteriormente, as lâminas foram descoradas numa solução de álcool-ácido (ácido clorídrico a 1% em etanol a 80%) durante um período de tempo variável, que dependeu da espessura do esfregaço (a descoloração foi avaliada por observação ao microscópio). As lâminas foram novamente lavadas em água corrente, seguindo-se a coloração com Hematoxilina de Gill *overnight*, nova lavagem em água corrente e, finalmente, a coloração com Eosina durante 5 a 10 minutos.

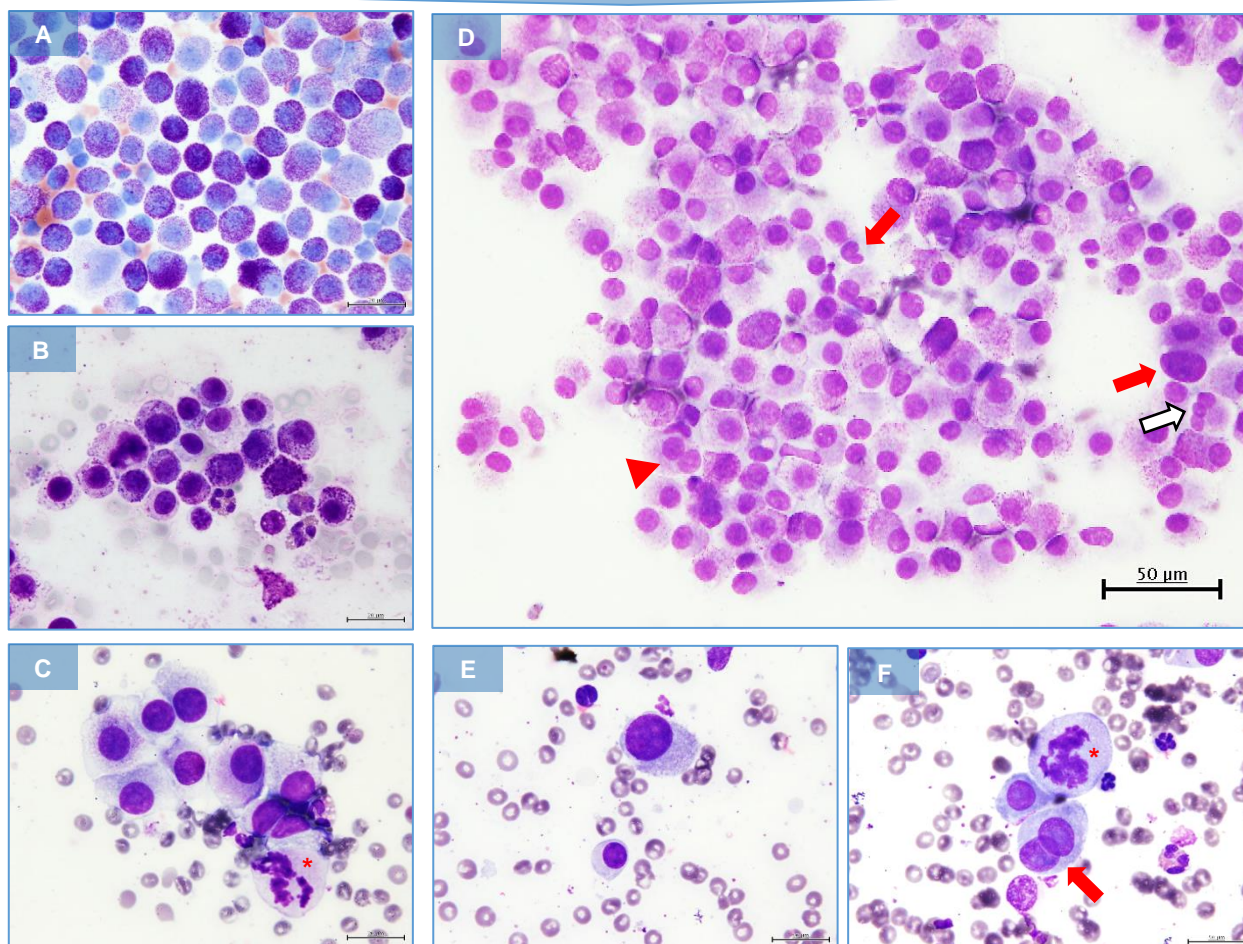


Figura 5. Mastocitomas cutâneos, cão. Coloração Diff-Quik™ (A-F). Elevada granulação (A). Granulação mista (coexistência de mastócitos bem granulados e escassamente granulados) (B). Granulação escassa, sendo possível a visualização de uma figura de mitose (asterisco) (C). Evidência de pleomorfismo nuclear (setas vermelhas), bem como a presença de mastócitos binucleado (cabeça-de-seta) e multinucleado (seta branca) (D). Identificação de anisocariose (>50% variação do diâmetro nuclear) (E), uma figura de mitose (asterisco) e um mastócito binucleado (seta) (F).

4.1.4 Determinação da área nuclear dos mastócitos com o 2D-nucleator

Foi determinada a área nuclear nos 51 casos segundo o método do 2D-nucleator (Figura 7). Para este método foram medidos cerca de 100 núcleos por caso. À semelhança do ensaio preliminar, foi usado um microscópio (Olympus BX50) equipado com uma câmara (Sony), uma platina motorizada (Prior) e sistema de análise estereológica (CAST-Grid, v. 1.60). As medições foram feitas na objetiva de imersão, sendo os mastócitos observados no monitor (ampliação final de 4050x). Os campos de grande ampliação foram selecionados de forma sistemática randomizada, sendo o primeiro campo determinado aleatoriamente e, a partir daí, a platina foi deslocada numa direção constante, no sentido de não se medirem células já avaliadas.

Foram realizadas medições da área nuclear média em mastócitos mono e binucleados, no sentido de averiguar eventuais diferenças entre os núcleos. A área média foi comparada por testes estatísticos (após realização dos testes de normalidade foi realizado o teste de Mann-Whitney). Foi usado o software de estatística anteriormente descrito (GraphPad Prism7) e considerado significativo um $p < 0,05$.

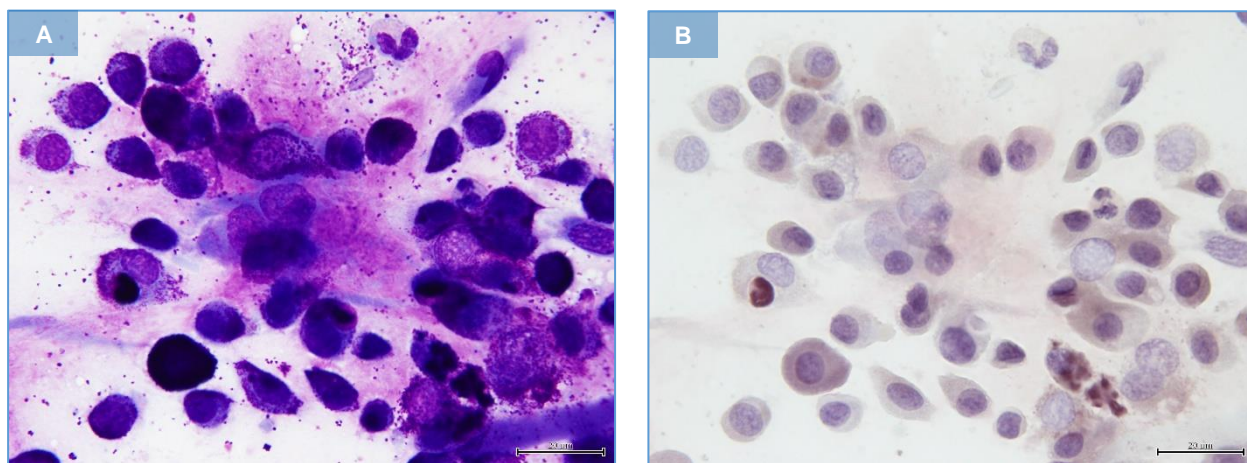


Figura 6. Mastocitoma cutâneo, cão. Preparação corada com Diff-Quik™ (A) e após recoloração com H&E (Hematoxilina de Gill) (B); a mesma área está patente em A e B.

4.1.5 Revisão do grau histopatológico

Dos 51 casos de mastocitomas, 32 apresentavam análise histopatológica. Nestes, 3 observadores (JM, MS, Patrícia Dias-Pereira) procederam à reavaliação consensual do grau histopatológico, para avaliar a relação entre a área nuclear média medida em citologia e o grau histopatológico. Foram determinados o grau de Kiupel e o de Patnaik num microscópio óptico de múltiplas cabeças.

A área nuclear média, medida em citologia, foi comparada nos tumores de baixo e alto grau de Kiupel e nos vários graus de Patnaik. Após a realização dos testes de normalidade, foram utilizados o teste de Mann-Whitney e o Kruskal-Wallis, respetivamente. Os valores da área nuclear média foram usados para a construção de uma curva ROC.

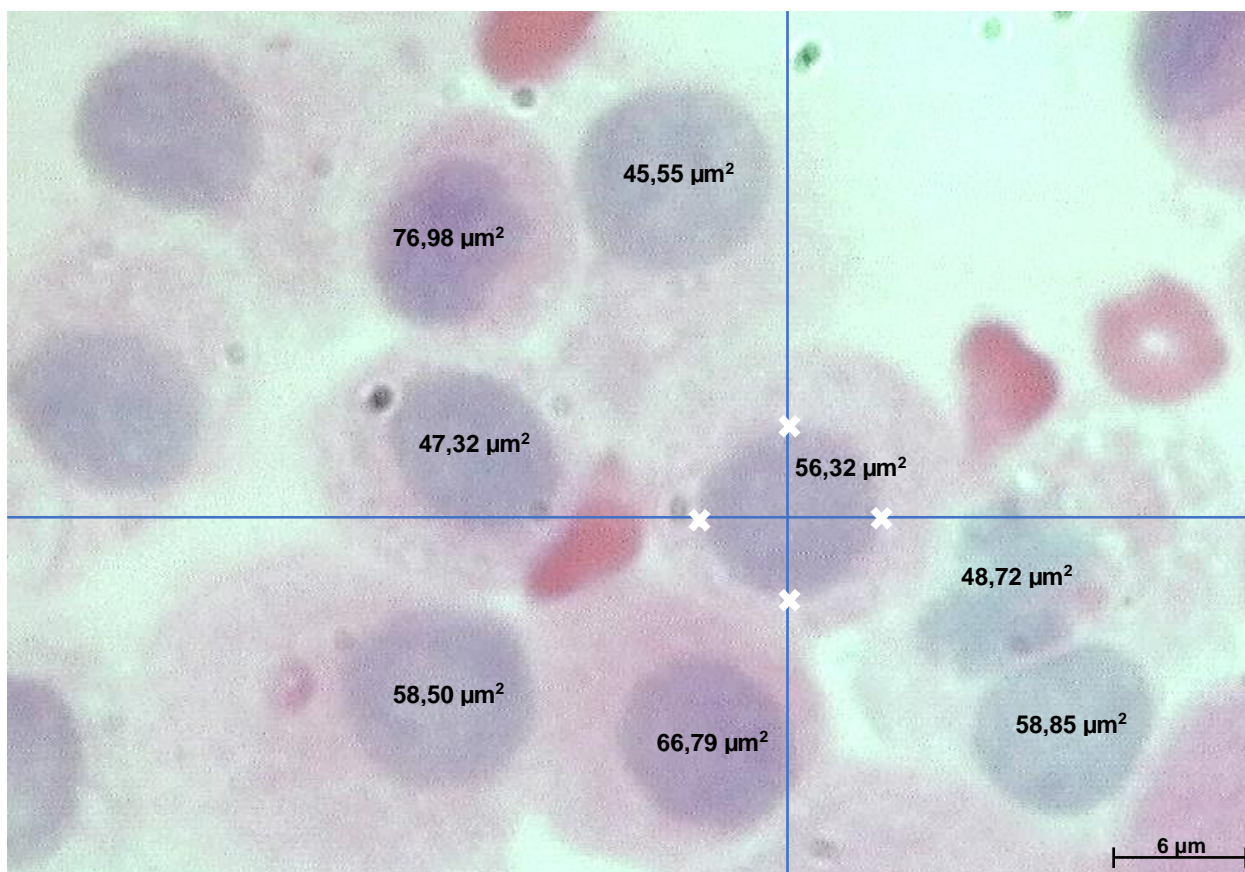


Figura 7. Mastocitoma cutâneo, cão. Preparação previamente corada com Diff-Quik™ e recorada com H&E (Hematoxilina de Gill). Na imagem, todos os valores posicionados sobre o núcleo correspondem à estimativa das áreas nucleares dos mastócitos, obtidas pelo 2D-nucleator; barra = 6μm (a imagem foi retirada diretamente do CAST-Grid, o que justifica a sua baixa resolução).

4.2 Resultados

Neste estudo foram incluídos 51 mastocitomas de 40 cães, 23 fêmeas (57,5%) e 17 machos (42,5%), com idades compreendidas entre os 5-16 anos (idade média no momento do diagnóstico = 9,8 anos). Neste grupo de animais, as raças mais representadas foram: Labrador Retriever ($n = 13$; 32,5%), Boxer ($n = 7$; 17,5%) e Golden Retriever ($n = 4$; 10%). Dois cães apresentavam múltiplos mastocitomas e 8 desenvolveram novos tumores ou recidivas. Os nódulos localizavam-se mais frequentemente no tronco/abdómen/flanco ($n = 16$; 31,4%), membros ($n = 16$; 31,4%), cabeça e pescoço ($n = 8$; 15,7%), região perineal/genital ($n = 7$; 13,7%) e noutros locais ($n = 4$; 7,8%).

Dos 51 mastocitomas, 29 (56,9%) foram classificados como baixo grau e 22 (43,1%) como alto grau segundo Camus et al¹⁵. Além dos parâmetros do grau¹⁵, foi estimada a percentagem de células cuja presença de granulação não permitia a distinção dos limites nucleares (Figura 8). Em 27 (53%) dos mastocitomas a percentagem de células com limites nucleares não visíveis era

$\leq 50\%$, em 24 casos (47%) essa percentagem era $>50\%$ (e em 11 [22%] ultrapassava mesmo os 75% de mastócitos com limites não visíveis).

A concordância interobservador para o grau citológico e para cada um dos seus componentes encontra-se apresentado em anexo (ver anexo II). No que diz respeito à anisocariose, os valores de k variaram entre 0,40-0,47, enquanto o ICC foi de 0,70, indicando uma reprodutibilidade baixa a moderada neste parâmetro citológico²⁸⁻²⁹.

Quando foi comparada a variabilidade dos núcleos dos mastócitos (expressa em termos de coeficiente de variação) nos casos em que cada um dos observadores considerou a anisocariose como presente e ausente, verificou-se que não havia diferenças estatisticamente significativas (Figura 9).

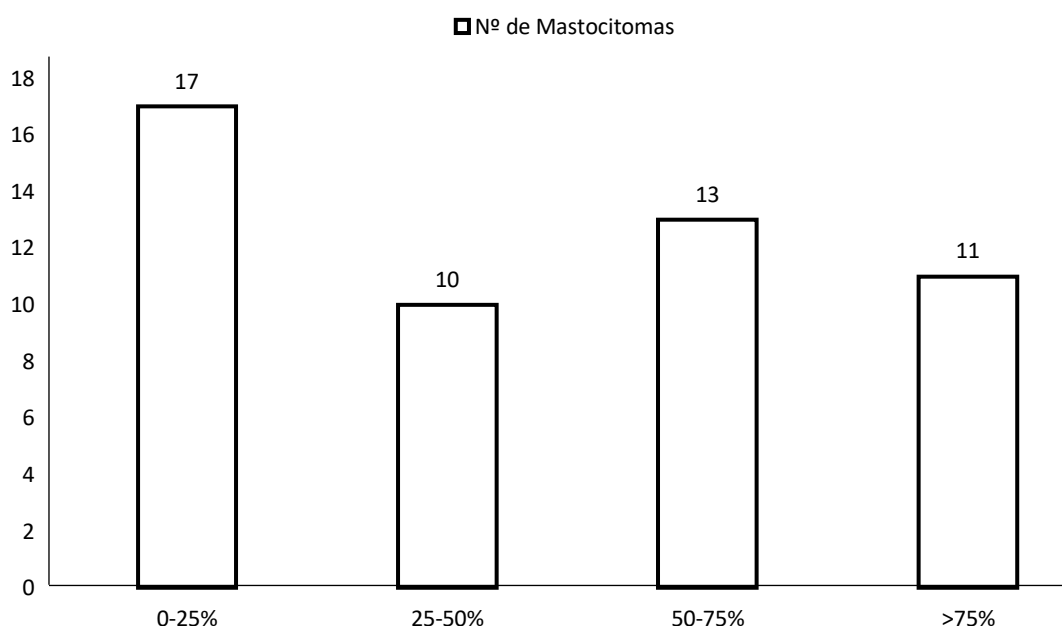


Figura 8. Estimativa da percentagem de células com limites nucleares não visíveis nas preparações em Diff-Quik™, nos 51 casos de mastocitomas.

Nas 51 amostras citológicas, foram medidos 5272 mastócitos mononucleados e 146 binucleados (média de 101 e 5 mastócitos mono- e binucleados por caso). Os mastócitos mononucleados apresentavam $57,3 \pm 14,0 \mu\text{m}^2$ de área nuclear média, ao passo que os binucleados apresentavam uma área nuclear média de $49,2 \pm 12,3 \mu\text{m}^2$ (Figura 10). Estas diferenças eram estatisticamente significativas ($p = 0,006$).

Com base nos resultados da quantificação dos mastócitos mononucleados, dos 51 mastocitomas, foi determinado um *cutoff* de $51,8 \mu\text{m}^2$ (sensibilidade = 0,80; especificidade = 0,65) a partir de uma curva ROC (Figura 11). Considerando este *cutoff*, os tumores podiam ser divididos em baixo e alto grau, com áreas nucleares médias inferiores ou superiores a $51,8 \mu\text{m}^2$,

respetivamente. Esta associação foi estatisticamente significativa (área debaixo da curva [AUC] = 0,812; $p = 0,008$).

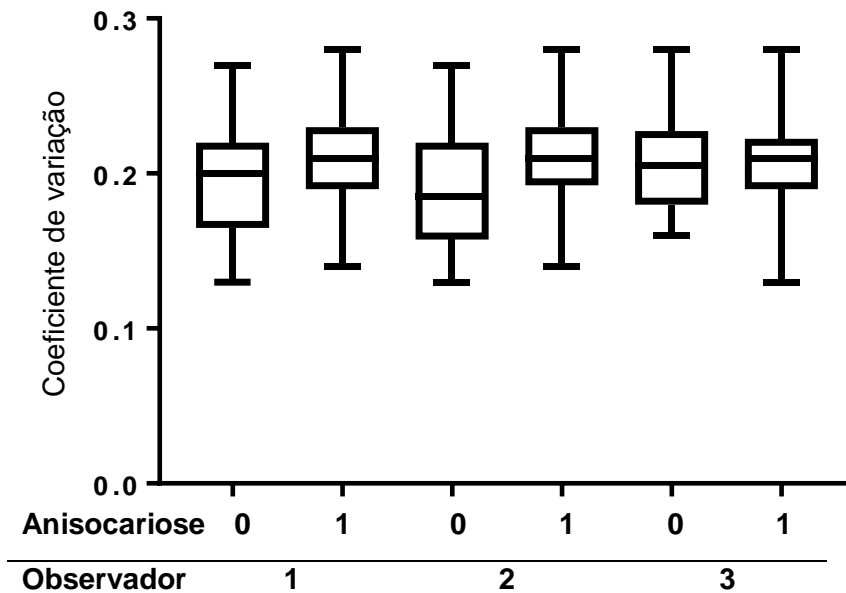


Figura 9. Coeficientes de variação da área nuclear dos mastócitos e comparação da avaliação da anisocariose pelos observadores (cujo score 0=ausente e 1=presente); dados expressos como “Box and whisker plots”.

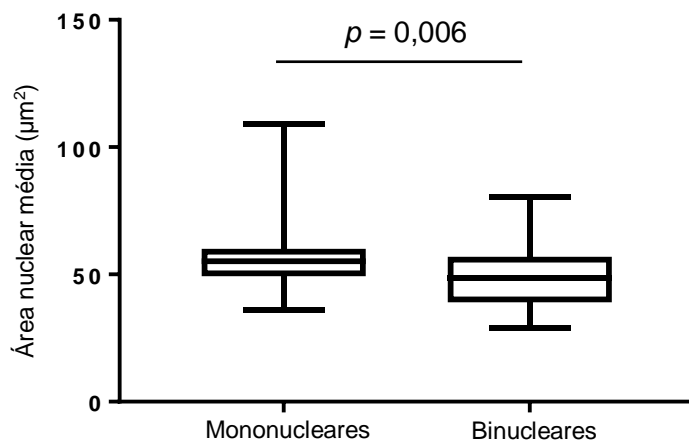


Figura 10. Estimativa da área nuclear média dos mastócitos mononucleados e binucleados nos 51 casos de mastocitomas, com recurso ao 2D-nucleator; dados representados como “Box and whisker plots”.

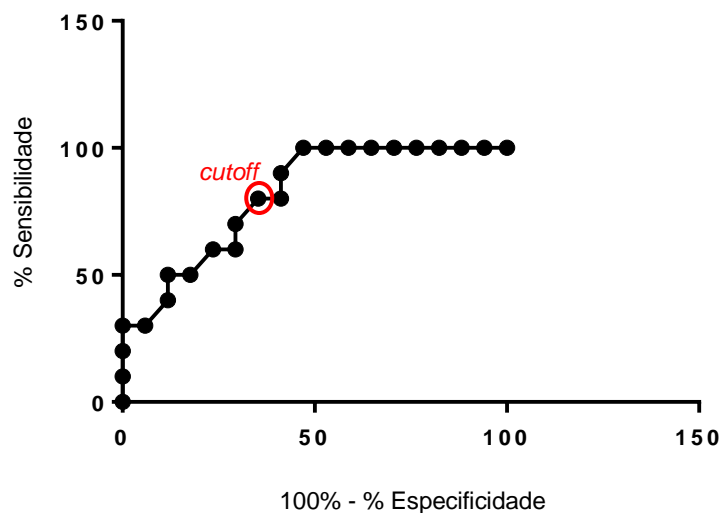


Figura 11. Curva ROC que estabelece um *cutoff* de $51,8 \mu\text{m}^2$. Área nuclear média $<51,8 \mu\text{m}^2$ para mastocitomas de baixo grau; área nuclear média $>51,8 \mu\text{m}^2$ para mastocitomas de alto grau.

Dos 32 mastocitomas com análise histopatológica, 22 (68,75%) foram classificados como baixo grau segundo Kiupel e 10 (31,25%) como alto grau¹¹. No que diz respeito à revisão do grau segundo Patnaik et al¹⁴, apenas 3 mastocitomas apresentavam invasão vascular. Destes, 2 foram classificados como grau II de Patnaik e 1 como grau III; todos os anteriores foram considerados de alto grau segundo o sistema de grau de Kiupel et al¹¹.

Comparando a área nuclear média dos mastócitos com o grau histopatológico segundo Kiupel et al¹¹ (Figura 12), verificou-se que os tumores de baixo grau apresentavam uma menor área nuclear média comparativamente com os tumores de alto grau ($50,33 \pm 6,48 \mu\text{m}^2$ e $59,22 \pm 9,40 \mu\text{m}^2$, respetivamente), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p = 0,006$). Já comparando a área nuclear média dos mastócitos com o grau histopatológico de Patnaik et al¹⁴ (Figura 13), verificou-se que não haviam diferenças estatisticamente significativas ($p = 0.106$) entre os 3 graus. No entanto, quando se consideravam apenas os graus II e III, existiam diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,037$). As áreas nucleares médias para os 3 graus de Patnaik eram de $49,89 \pm 5,83 \mu\text{m}^2$, $51,87 \pm 6,73 \mu\text{m}^2$ e $67,03 \pm 13,53 \mu\text{m}^2$ para os graus I, II e III, respetivamente.

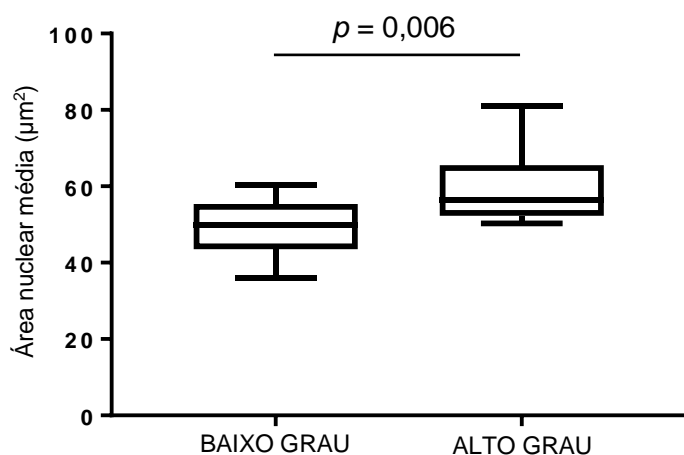


Figura 12. Comparação das áreas nucleares médias com o grau histopatológico de Kiupel (baixo e alto grau); dados expressos como “Box and whisker plots”.

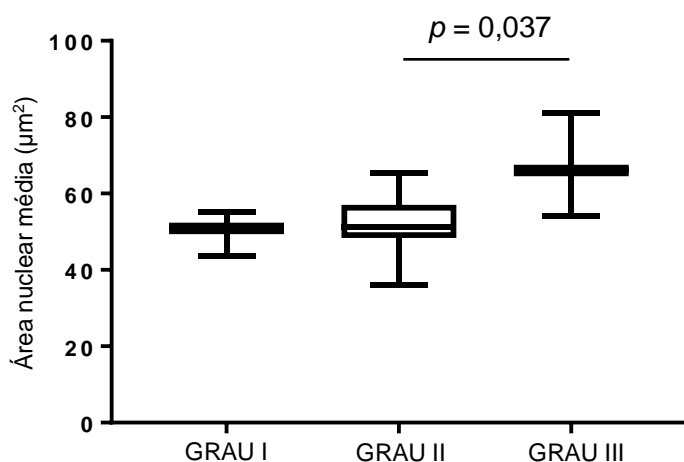


Figura 13. Comparação das áreas nucleares médias com o grau histopatológico de Patnaik (graus I, II e III); dados expressos como “Box and whisker plots”.

4.3 Conclusões

A importância dos mastocitomas cutâneos na população canina tem justificado diversas abordagens com vista ao desenvolvimento de ferramentas com potencial prognóstico. Uma dessas abordagens consiste na avaliação da morfometria nuclear. Este trabalho teve como principais objetivos a otimização de métodos de quantificação da área nuclear média dos mastócitos em amostras citológicas de mastocitomas cutâneos caninos, e o estudo da relação desses dados quantitativos com o grau histopatológico.

Relativamente à amostra estudada, não foi evidenciada nenhuma predisposição relativa ao género e as raças mais representadas foram Labrador Retriever, Boxer e Golden Retriever, à semelhança de trabalhos anteriores^{3,6-7,19}. Também a idade média dos animais no momento do diagnóstico (9,8 anos) foi semelhante aos estudos anteriores^{3,6,19}. Na nossa amostra, apenas 5% dos cães ($n = 2$) exibia mais do que um nódulo, um pouco menos do que os 10-15% de mastocitomas múltiplos descritos na bibliografia⁷. Quanto à localização das lesões, estas foram mais frequentes no tronco e membros o que vai de encontro à bibliografia existente⁷.

Estratégias diagnósticas mais céleres, que permitam um melhor planeamento do tratamento médico e cirúrgico, são importantes nos mastocitomas. O diagnóstico citológico apresenta vantagens indiscutíveis nestas neoplasias, mas o diagnóstico histopatológico continua a ser a pedra basilar para a definição do prognóstico dos mastocitomas cutâneos caninos. A simplicidade e rapidez, com emissão de resultado numa fase inicial da abordagem ao animal são vantagens da citologia. Além disso, as características celulares e nucleares dos mastócitos preservam-se melhor em citologia, uma vez que não existem as perdas de detalhe celular e variações do tamanho inerentes ao processamento histológico para parafina^{18,22}.

Considerando estas vantagens, foi proposto um sistema de grau citológico que apresentou uma boa correlação com o grau histológico e valor prognóstico¹⁵. No presente estudo, foi atribuído o grau citológico a 51 mastocitomas e estudada a reprodutibilidade interobservador (ver anexo II). Em geral, a reprodutibilidade interobservador do grau citológico foi moderada, o que contrasta com Camus et al que descreveram uma consistência de 75%¹⁵. Essa menor concordância pode ser justificada, quer pela dificuldade da avaliação de alguns parâmetros, nomeadamente em amostras com células muito granulares, quer por alguma subjetividade dos parâmetros definidos. Na verdade, com exceção da granulação, os restantes 4 parâmetros (pleomorfismo nuclear, figuras de mitose, binucleação/multinucleação e anisocariose) são muito dependentes do observador e do tempo de observação da lâmina. Por exemplo, não está estabelecido quantas figuras de mitose devem ser encontradas por lâmina ou cga, nem o número de cga ou celularidade a observar por lâmina, o que faz com que este parâmetro dependa do tempo que o observador dedique a cada caso. A anisocariose é, provavelmente, o parâmetro

mais difícil de interpretar, quer pela indefinição deste parâmetro no grau citológico¹⁵, quer pela incapacidade do olho humano em discriminar pequenas variações no tamanho dos núcleos. No nosso estudo, encontramos uma baixa a moderada reprodutibilidade deste parâmetro citológico, o que está concordante com dados doutros tumores, como neoplasias mamárias ou orais³⁰⁻³¹.

Além da subjetividade dos critérios, a aplicação do sistema de grau citológico também é dificultada pela granulação dos mastócitos que, muitas vezes, impede a visualização dos detalhes nucleares. Neste caso, é de destacar que em 47% dos casos a granulação mascarava os limites nucleares em mais de metade das células. Este problema foi ultrapassado com a recoloração das amostras citológicas com H&E (Hematoxilina de Gill), que permitiu uma melhor observação dos detalhes nucleares, possibilitando, por exemplo, a identificação de células binucleadas não visíveis em Diff-Quik™. Neste sentido, Ressel e Finotello²⁶ propuseram o uso da coloração H&E para o *grading* citológico dos mastocitomas. Recentemente, Scarpa et al¹⁷ e Hergt et al¹⁸ procederam à descoloração das amostras citológicas de mastocitomas, recorrendo-as depois com H&E. Este procedimento aumenta a sensibilidade do grau citológico e diminui a proporção de falsos negativos¹⁸.

A “ausência” de grânulos e a clara observação do núcleo e dos seus limites é essencial para a medição da área nuclear dos mastócitos. Estudos encetados por Strefezzi et al^{3,19} e Neto et al²¹ já demonstraram a utilidade da morfometria nuclear em amostras citológicas de mastocitomas e já definiram esta metodologia como reprodutível intra- e interobservador⁶. Esses trabalhos concluíram que a morfometria nuclear poderá ser um bom indicador de prognóstico³, aumentando o valor diagnóstico da citologia. No entanto, esses trabalhos usaram uma metodologia diferente da que foi aqui aplicada (Tabela 2), no sentido em que as amostras foram coradas com corantes Romanowsky e foram usados métodos manuais de contorno dos núcleos. É importante realçar que no estudo preliminar comparámos diferentes estratégias de medição e que não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os métodos. Neste trabalho foi usado o 2D-nucleator por ser o método mais preciso, com menor coeficiente de erro. Globalmente, pode dizer-se que este método pode apresentar três desvantagens: 1) é mais demorado que a contagem de pontos; 2) requer software específico, o que pode inviabilizar uma utilização rotineira por muitos laboratórios; 3) a identificação do nucléolo pelo operador pode ser um procedimento subjetivo. Ainda assim, o 2D-nucleator é muito mais eficiente do que o contorno nuclear usado previamente^{19,21}. De destacar que esses trabalhos procederam à quantificação em amostras coradas com corantes Romanowsky (Giemsa ou Panoptic). Considerando que muitos mastócitos tinham limites nucleares obscurecidos (segundo os nossos dados), é possível que tenha sido introduzido algum viés nesses trabalhos, uma vez que as medições poderão ter sido efetuadas nos mastócitos menos granulares da amostra. Uma outra diferença entre este estudo e os anteriores prende-se com o grau histopatológico utilizado. Strefezzi et al¹⁹ e Neto et

al²¹ relacionaram as áreas nucleares médias com o grau histopatológico de Patnaik que vigorava na altura, ao passo que neste trabalho, as áreas nucleares médias foram relacionadas com os graus histopatológicos de Patnaik e Kiupel. Neste estudo, a área nuclear média por cada grau de Patnaik foi menor do que a descrita por Strefezzi et al¹⁹ e Neto et al²¹ (Tabela 2), o que pode ser justificado pela metodologia de recoloração (que permitiu ver melhor os núcleos e ser mais preciso). Entretanto, os nossos valores por grau não são comparáveis aos descritos com coloração H&E por Strefezzi et al¹⁹, uma vez que nessas amostras foi realizada uma fixação húmida em álcool por 24 horas, que tende a encolher as células e os seus componentes.

Tabela 2. Análise comparativa dos trabalhos de Strefezzi et al¹⁹, Neto et al²¹ e do presente trabalho.

	Método Quantificação	Sistema de Grau Histopatológico	Coloração	Áreas nucleares médias
Strefezzi et al, 2003	Análise de imagem	Patnaik (I, II e III)	Panoptic	64,35 ± 7,35; 69,26 ± 6,44; 74,33 ± 1,43
			H&E	47,25 ± 3,76; 49,98 ± 5,04; 62,65 ± 12,03
Neto et al, 2010	Análise de imagem	Patnaik (II e III)	Giemsa	72,3 ± 13,9; 88,9 ± 19,0
Presente Estudo	2D-nucleator	Patnaik (I, II e III)	H&E	49,89 ± 5,83; 51,87 ± 6,73; 67,03 ± 13,54
		Kiupel (baixo e alto graus)		50,33 ± 6,48; 59,22 ± 9,40

Nos dias de hoje, os sistemas de grau histopatológico de Patnaik et al¹⁴ e Kiupel et al¹¹ são os mais utilizados. O sistema mais recente surgiu na tentativa de aumentar a concordância interobservador e eliminar a ambiguidade inerente ao predomínio de mastocitomas de grau II, que eram falhas apontadas ao sistema de Patnaik. Neste estudo, o grau histopatológico de 32 mastocitomas foi revisto segundo os dois sistemas de grau. Todos os tumores de grau I e III de Patnaik foram de baixo e alto grau de Kiupel, tal como já foi demonstrado^{16,32}. Já quanto aos tumores de grau II de Patnaik, 73% eram de baixo grau de Kiupel, enquanto os restantes 27% eram de alto grau. Curiosamente, Sabbatini et al¹⁶ e Stefanello et al³² também demonstraram que 83-86% e 14-16% dos tumores de grau II eram de baixo e alto grau de Kiupel, respetivamente^{16,32}. É importante destacar que a área nuclear média dos mastócitos nos tumores de alto grau de Kiupel era significativamente maior do que nos de baixo grau. Já quando foi usado o grau de Patnaik não se verificaram diferenças estatísticas na comparação dos 3 graus. Estas diferenças só existiam aquando da comparação do grau II com III (e I com III), tal como já havia sido descrito^{19,21}.

Neste estudo foram determinados dois *cutoffs* com significados diferentes. Áreas nucleares médias acima e abaixo do primeiro *cutoff* (51,8 μm^2) permitem considerar um mastocitoma de alto ou baixo grau, com 80% de sensibilidade e 65% de especificidade. Este *cutoff* é semelhante ao determinado anteriormente por Strefezzi et al³ (*cutoff* = 52,29 μm^2 ; sensibilidade = 0,82; especificidade = 0,72) num estudo de prognóstico, ainda que nesse caso os autores tenham usado fixação húmida das amostras. Já o segundo *cutoff* tem um significado diferente: se o médico veterinário quiser aplicar um tratamento mais agressivo ou mais dispendioso, aí deverá considerar-se um *cutoff* de 62,83 μm^2 (sensibilidade = 0,30; especificidade = 1,00) já que, neste caso, a probabilidade de encontrar um falso positivo é nula (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados curva ROC: *cutoffs*

Área nuclear	Sensibilidade	Especificidade
> 50.9	80	58,82
> 51.82	80	64,71
> 53.36	70	70,59
> 54.57	60	70,59
> 55.38	60	76,47
> 56.28	50	82,35
> 57.2	50	88,24
> 58.14	40	88,24
> 59.58	30	94,12
> 62.83	30	100
> 65.7	20	100

Ainda relativamente à área nuclear, é importante destacar que foram encontradas diferenças entre mastócitos mononucleados e binucleados, com menor área destas últimas. A justificação pode residir no facto de que quando o volume nuclear duplica (isto é, presença de dois núcleos), a área da superfície celular aumenta apenas 1,4 vezes pelo que os componentes nucleares sofrem um rearranjo espacial³³. Assim, os núcleos de células binucleadas são tendencialmente mais pequenos, comparativamente aos de células mononucleadas. Estas diferenças de tamanho existem em órgãos que possuem células mono- e binucleadas, tais como o fígado³⁴. Apesar deste achado, a importância desta diferença no contexto dos mastocitomas é ainda desconhecida.

Concluindo, este trabalho demonstrou a utilidade da quantificação em citologia dos mastocitomas cutâneos caninos. Foram testadas várias estratégias de medição que apresentaram resultados semelhantes. Ainda que o 2D-nucleator tenha sido usado para a quantificação, este poderá ser substituído pela utilização da contagem de pontos, que é uma

ferramenta de fácil acesso. Foi aqui demonstrada a importância da recoloração com H&E, que melhora a visualização dos detalhes nucleares, o que é fundamental para a quantificação. Foram aqui demonstradas falhas na objetividade dos critérios do grau citológico recentemente proposto, nomeadamente em relação ao parâmetro anisocariose. Este trabalho demonstrou uma relação estatisticamente significativa entre o grau histopatológico e a área nuclear média dos mastócitos, tendo sido determinados *cutoffs* com potencial utilidade clínica. Ao fornecer dados mais objetivos e reprodutíveis, a morfometria nuclear pode contribuir para instituir mais precocemente um plano terapêutico e/ou cirúrgico ao animal. O objetivo último desta quantificação não será substituir o grau histopatológico, mas antes complementá-lo com ferramentas não enviesadas, objetivas e reprodutíveis entre observadores.

5. PERSPETIVAS FUTURAS

Uma das grandes limitações deste trabalho prende-se com o facto de a duração do estágio curricular não ter permitido a recolha de informações sobre o período de *follow-up* dos animais. Assim sendo, no futuro seria importante que este trabalho fosse continuado com o intuito de incluir a informação clínica dos animais após o diagnóstico de mastocitoma cutâneo e, também, de aumentar o tamanho da amostra. Apesar de ter sido demonstrada uma diferença estatisticamente significativa entre a área nuclear média dos mastócitos relativamente ao grau histopatológico, a verdade é que estes resultados serão ainda mais relevantes se forem relacionados, diretamente, com indicadores de prognóstico e de sobrevivência. Seria também relevante relacionar estes dados quantitativos com outros marcadores de proliferação celular como o AgNOR e o Ki67 e com mutações no recetor c-Kit.

Relativamente ao recente sistema de grau citológico proposto por Camus et al¹⁵, seria importante a revisão dos parâmetros de forma a torná-los mais objetivos e reprodutíveis. Neste sentido seria importante definir claramente o parâmetro anisocariose e quando se considera a existência de pleomorfismo nuclear (e em quantas células). Seria também importante estipular o número de figuras de mitose/cga, assim como o número de células binucleadas ou multinucleadas/cga. A granulação é o critério mais consensual, no entanto, este pode estar sobrevalorizado já que, segundo Camus et al¹⁵, um mastocitoma pouco granular é, desde logo, um tumor de alto grau citológico. A baixa reprodutibilidade de alguns dos parâmetros do grau citológico justifica sessões de treino e estudos com painéis alargados de observadores. Uma vez que foi aqui encontrada uma moderada reprodutibilidade, seria igualmente importante investigar o seu impacto na decisão clínica.

Como última nota, é importante ressaltar que as ferramentas estereológicas fornecem informação útil na avaliação citológica dos mastocitomas. Contudo, elas devem ser vistas como complementares à avaliação citológica e histopatológica destas neoplasias, não devendo ser encaradas como substitutos destes exames.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Bloom F (1942) "Spontaneous solitary and multiple mast cell tumors ("Mastocytoma") in dogs" **Archives of Pathology & Laboratory Medicine** 33, 661
2. Cowell RL, Valenciano AC (2014) "Round Cells" **Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat** 4th Ed, 70-74
3. Strefezzi RDF, Xavier JG, Kleeb SR, Catão-Dias JL (2009) "Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors" **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 21, 821-825
4. Peleteiro MC, Marcos R, Santos M, Correia J, Pissarra H, Carvalho T (2011) "Pele, seus Anexos e Tecido Subcutâneo" **Atlas de Citologia Veterinária** 94-95
5. Sledge DG, Webster J, Kiupel M (2016) "Canine cutaneous mast cell tumors: a combined clinical and pathologic approach to diagnosis, prognosis, and treatment selection" **The Veterinary Journal** 215, 43-54
6. Barbosa DFL, Paraventi MD, Strefezzi RDF (2014) "Reproducibility of nuclear morphometry parameters from cytologic smears of canine cutaneous mast cell tumors – intra- and interobserver variability" **Veterinary Clinical Pathology** 1-4
7. Weiss DJ, Wardrop KJ (2010) "Mast Cell Cancer" **Schalm's Veterinary Hematology** 6th Ed, 483-488
8. Cole W (1990) "Mast cell tumor in a puppy" **Canadian Veterinary Journal** 31, 457
9. Davies B, Page R, Sannes P (1992) "Cutaneous mastocytoma in a dog" **Veterinary Pathology** 29, 363-365
10. Raskin RE, Meyer DJ (2016) "Skin and Subcutaneous Tissues" **Canine And Feline Cytology: A Color Atlas And Interpretation Guide** 3rd Ed, 78-82

11. Kiupel M, Webster JD, Bailey KL, Best S, DeLay J, Detrisac CJ, Fitzgerald SD, Gamble D, Ginn PE, Goldschmidt MH, Hendrick MJ, Howerth EW, Janovitz EB, Langohr I, Lenz SD, Lipscomb TP, Miller MA, Misdorp W, Moroff S, Mullaney TP, Neyens I, O'Toole D, Ramos-Vara J, Scase TJ, Schulman FY, Sledge D, Smedley RC, Smith K, Snyder PW, Southorn E, Stedman NL, Steficek BA, Stromberg PC, Valli VE, Weisbrode SE, Yager J, Heller J, Miller R (2011) "Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior" **Veterinary Pathology** 48, 147-155
12. Hottendorf GH, Nielsen SW (1967) "Pathologic study of 300 extirpated canine mastocytomas" **Zentralbl Veterinaarmed [A]** 14, 272-281
13. Bostock DE (1973) "The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs" **Journal of Small Animal Practice** 14, 27-41
14. Patnaik AK, Ehler WJ, MacEwen EG (1984) "Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs" **Veterinary Pathology** 21, 469-474
15. Camus MS, Priest HL, Koehler JW, Driskell EA, Rakich PM, Ilha MR, Krimer PM (2016) "Cytologic criteria for mast cell tumor grading in dogs with evaluation of clinical outcome" **Veterinary Pathology** 1-7
16. Sabattini S, Scarpa F, Berlato D, Bettini G (2015) "Histologic grading of canine mast cell tumor: is 2 better than 3?" **Veterinary Pathology** 52, 70-73
17. Scarpa F, Sabattini S, Bettini G (2016) "Cytological grading of cutaneous mast cell tumors" **Veterinary and Comparative Oncology** 14, 245-251
18. Hergt F, Bomhard WV, Kent MS, Hirschberger J (2016) "Use of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors on cytology specimens" **Veterinary Clinical Pathology** 1-7
19. Strefezzi RDF, Xavier JG, Catão-Dias JL (2003) "Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors" **Veterinary Pathology** 40, 268-275
20. Maiolino P, Cataldi M, Paciello O, Restucci B, Vico GD (2005) "Nucleomorphometric analysis of canine cutaneous mast cell tumours" **Journal of Comparative Pathology** 133, 209-211
21. Neto RT, Pinczowski P, Rahal SC, Kitchell BE, Amorim RL (2010) "Cytoplasmic and nuclear morphometric parameters in cytologic preparations of canine cutaneous mast cell tumors" **Brazilian Journal of Veterinary Pathology** 3, 93-99
22. Kidney BA, Meachern MD (2014) "Morphometric studies in veterinary cytology" **Veterinary Clinical Pathology** 43/3, 305-309

23. Marcos R, Santos M, Santos N, Malhão F, Ferreira F, Monteiro RAF, Rocha E (2009) "Use of destained cytology slides for the application of routine special stains" **Veterinary Clinical Pathology** 38, 94–102.
24. Gundersen HJ (1988) "The nucleator" **Journal of Microscopy** 151, 3-21
25. Larsen JO (1998) "Stereology of nerve cross sections" **Journal of Neuroscience Methods** 85, 107-118
26. Ressel L, Finotello R (2016) "Cytological grading of canine cutaneous mast cell tumours: is haematoxylin and eosin staining better than May-Grünwald–Giemsa?" **Veterinary and Comparative Oncology** (*in press*: DOI: 10.1111/vco.12234)
27. Graham JS, Bryant MA, Kirkpatrick LJ, Moltrup DL (1994) "Staining mast cells for morphometric evaluation on an image analysis system" **Biotechnic & Histochemistry** 69, 121-126
28. Viera AJ, Garrett JM (2005) "Understanding interobserver agreement: the kappa statistic" **Family Medicine** 37, 360-363
29. Koo TK, Li MY (2016) "A guideline of selecting and reporting intraclass correlation coefficients for reliability research" **Journal of Chiropractic Medicine** 15, 155–163
30. Frierson Hf, Wolber Ra, Berean Kw, Franquemont Dw, Gaffey Mj, Boyd Jc, Wilbur Dc (1995) "Interobserver reproducibility of the nottingham modification of the bloom and richardson histologic grading scheme for infiltrating ductal carcinoma" **American Journal of Clinical Pathology** 103, 195-198
31. Bryne M, Nielsen K, Koppang HS, Dabelsteen E (1991) "Grading of nuclear pleomorphism in oral carcinomas. Higher prognostic value than stereological assessment of nuclear volume" **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica** 99, 333-339
32. Stefanello D, Buracco P, Sabattini S, Finotello R, Giudice C, Grieco V, Iussich S, Tursi M, Scase T, Palma SD, Bettini G, Ferrari R, Martano M, Gattino F, Marrington M, Mazzola M, Vasconi ME, Annoni M, Marconato L (2015) "Comparison of 2- and 3-category histologic grading systems for predicting the presence of metastasis at the time of initial evaluation in dogs with cutaneous mast cell tumors: 386 cases (2009–2014)" **Journal of the American Veterinary Medical Association** 246, 765-769
33. Pandit SK, Westendorp B, Bruin A (2013) "Physiological significance of polyploidization in mammalian cells" **Trends in Cell Biology** 23, 556-566
34. Marcos R, Lopes C, Malhão F, Correia-Gomes C, Fonseca S, Lima M, Gebhardt R, Rocha E "Stereological assessment of sexual dimorphism in the rat liver reveals differences in hepatocytes and Kupffer cells but not hepatic stellate cells" **Journal of Anatomy** 228, 996-1005

ANEXO I – Protocolo de colorações avaliadas no estudo preliminar

- **Azul de toluidina**

1. Desmontar lâminas em xilol até remoção da lamela, hidratar em série decrescente de álcoois e lavar (água corrente e água destilada);
2. Corar com azul de toluidina 1/1000 (30 segundos);
3. Diferenciar em álcool a 95% (até o esfregaço ficar azul claro);
4. Passar por álcool absoluto;
5. Colocar em xilol e montar.

- **Hematoxilina-Eosina (H&E) (Hematoxilina de Mayer)**

1. Desmontar lâminas em xilol até remoção da lamela, hidratar em série decrescente de álcoois e lavar em água corrente (1 minuto);
2. Corar com Hematoxilina de Mayer (2 minutos);
3. Lavar em água corrente (5 minutos);
4. Diferenciar numa solução de álcool-ácido (ácido clorídrico a 0,5% em etanol a 80%);
5. Lavar em água corrente (5 minutos);
6. Corar em Eosina a 1% aquosa (2 minutos);
7. Lavar em água corrente (passagem rápida);
8. Desidratar em série crescente de álcoois (1 minuto em cada), colocar em xilol e montar.

- **Hematoxilina-Eosina (H&E) (Hematoxilina de Gill)**

1. Desmontar lâminas em xilol até remoção da lamela, rehidratar em série decrescente de álcoois e lavar em água corrente (1 minuto);
2. Descorar numa solução de álcool-ácido (ácido clorídrico a 1% em etanol a 80%) durante um período de tempo variável (dependo da espessura do esfregaço);
3. Lavar em água corrente (5 minutos);
4. Corar com Hematoxilina de Gill (*overnight*);
5. Lavar em água corrente (5 minutos);
6. Corar com Eosina (5-10 minutos);
7. Lavar em água corrente (passagem rápida);
8. Desidratar em série crescente de álcoois (1 minuto em cada), colocar em xilol e montar.

Estudo da reprodutibilidade interobservador do grau citológico dos mastocitomas cutâneos caninos

Interobserver reproducibility in cytologic grading of canine cutaneous mast cell tumors

Joana Marques¹, Patrícia Dias-Pereira², Carla Correia-Gomes³, Ricardo Marcos¹, Marta Santos¹

¹Cytology Diagnostic Service, Laboratory of Histology and Embryology, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, ICBAS-UP, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228; 4050-313 Porto – Portugal

²Department of Pathology and Molecular Immunology, ICBAS-UP

³Epidemiology Research Unit, Future Farming Systems, Scotland's Rural College (SRUC), Inverness, UK

Resumo: Recentemente foi proposto um método para determinação do grau citológico de mastocitomas caninos baseado na avaliação dos parâmetros: granulação, figuras de mitose, pleomorfismo nuclear, presença de células bi/multinucleadas e anisocariose. Os tumores são classificados em alto grau quando apresentam escassa granulação citoplasmática ou, pelo menos, dois dos restantes parâmetros. Apesar das vantagens descritas para este método, como sejam a concordância interobservador e a correlação com o grau histológico, não existem estudos acerca da reprodutibilidade dos parâmetros do grau citológico. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi determinar a reprodutibilidade interobservador na determinação do grau citológico. Selecionaram-se retrospectivamente 52 casos citológicos de mastocitomas. Em 5 casos, os 3 observadores aferiram os critérios de avaliação dos parâmetros do grau num microscópio multiocular. Nos restantes 47 casos, os 3 observadores atribuíram o grau de modo independente. A concordância interobservador foi analisada com recurso à estatística kappa (k) e ao coeficiente de correlação intraclasse (ICC). Nos pares de observadores os valores de k variavam entre 0,22-0,6, enquanto o ICC era de 0,69, indicativos de baixa a moderada reprodutibilidade na atribuição do grau citológico. Dos parâmetros do grau, a granulação e a presença de figuras de mitose eram os mais concordantes entre os observadores, enquanto a presença de células bi/multinucleadas e de pleomorfismo nuclear eram os menos reprodutíveis. A reprodutibilidade de alguns dos parâmetros do grau citológico é baixa o que justifica sessões de treino, estudos com painéis alargados de observadores, assim como a avaliação do impacto da reprodutibilidade do grau citológico na decisão clínica.

Summary: Recently, a new cytologic grading method for canine mast cell tumors has been proposed, based on the assessment of: granularity, mitotic figures, nuclear pleomorphism, the presence of bi/multinucleated cells and anisokaryosis. A tumor is classified as high grade if it was poorly granulated or has at least two of remaining parameters. The consistency among observers and the high correlation with the histologic grade are some advantages of this method. However, to the best of our knowledge there is no study addressing the interobserver reproducibility of the cytologic grading parameters. The aim of this study was to determine the interobserver agreement in the assignment of the cytological grade. A sample of 52 mast cell tumors was retrospectively selected. In 5 cases, the 3 observers reviewed the criteria for the evaluation of grading parameters in a multi-headed microscope. In the remaining 47 cases each observer graded individually the tumors. The interobserver agreement was computed by the kappa statistics and by the intraclass correlation coefficient (ICC). Kappa values ranged from 0.22-0.6 while the ICC was 0.69, indicating a low to moderate agreement in the cytological grade. Higher agreement was obtained for the evaluation of granularity and mitotic figures, while the presence of bi/multinucleated cells and nuclear pleomorphism were less reproducible parameters. In conclusion, the reproducibility of some grading parameters was low which justifies training sessions and studies with a large panel of observers. The impact of the level of reproducibility of the cytologic grading method in clinical decisions deserves further studies.

Nas Tabelas a e b são apresentados os resultados estatísticos relativos ao estudo de reprodutibilidade interobservador dos parâmetros do grau citológico. Em ambas, as células preenchidas a amarelo indicam uma boa concordância interobservadores, a laranja uma concordância moderada e a vermelho uma concordância baixa.

Tabela a. Concordância interobservadores – estatística Kappa (*kappa unweighted, K_u or kappa weighted, K_w*).

Observadores	<i>K</i>	Granulação	Figuras de Mitose	Pleomorfismo Nuclear	Bi/multi-nucleação	Anisocariose	GRAU
1 versus 2	K_u	0.39 (0.17;0.62) $P=0.0002$	0.76 (0.51;1) $P=0.0007$	0.36 (0.071;0.66) $P=0.02$	0.43 (0.15;0.71) $P=0.007$	0.43 (0.15;0.71) $P=0.007$	0.61 (0.38;0.84) $P<0.0001$
	K_w	0.63 (0.47;0.78)	-	-	-	-	-
1 versus 3	K_u	0.51 (0.29;0.72) $P<0.0001$	Não avaliado	0.21 (-0.1;0.52) $P=0.1488$	0.03 (-0.25;0.31) $P=0.421$	0.40 (0.11;0.69) $P=0.0138$	0.22 (-0.062;0.5) $P=0.071$
	K_w	0.67 (0.51;0.84)	-	-	-	-	-
2 versus 3	K_u	0.45 (0.23;0.67) $P<0.0001$	Não avaliado	0.38 (0.08;0.67) $P=0.0227$	0.26 (-0.02;0.53) $P=0.054$	0.47 (0.19;0.75) $P=0.0042$	0.43 (0.17;0.69) $P=0.002$
	K_w	0.65 (0.49;0.80)	-	-	-	-	-

Tabela b. Concordância interobservadores – coeficiente de correlação intraclasse (ICC).

Observadores	Granulação	Figuras de Mitose	Pleomorfismo Nuclear	Bi/multi-nucleação	Anisocariose	GRAU
1, 2 e 3	0.85 (0.76;0.91) $P<0.0001$	0.62 (0.38;0.78) $P<0.0001$	0.59 (0.34;0.76) $P=0.0001$	0.48 (0.16;0.69) $P=0.004$	0.70 (0.51;0.82) $P<0.0001$	0.69 (0.49;0.82) $P<0.0001$

INTEROBSERVER REPRODUCIBILITY IN CYTOLOGIC GRADING OF CANINE CUTANEOUS MAST CELL TUMORS

Joana Marques¹, Patrícia Dias-Pereira², Carla Correia-Gomes³, Ricardo Marcos¹, Marta Santos¹

¹Cytology Diagnostic Service, Laboratory of Histology and Embryology, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, ICBAS-UP, Universidade do Porto,

Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228; 4050-313 Porto – Portugal

²Department of Pathology and Molecular Immunology, ICBAS-UP

³Epidemiology Research Unit, Future Farming Systems, Scotland's Rural College (SRUC), Inverness, UK

Introduction

- Mast cell tumors (MCTs) are the most frequent cutaneous neoplasm in dogs. Biological behavior is variable and histologic grading remains a cornerstone of MCT prognostication.

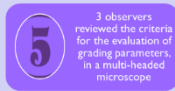
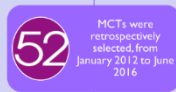
- Recently, a new cytologic grading method has been proposed¹, based on the assessment of: granularity, mitotic figures, nuclear pleomorphism, the presence of bi/multinucleated cells and anisokaryosis (Figs. 1-6).

Aims

- To the best of our knowledge there is no study addressing the interobserver reproducibility of the cytologic grading parameters. Therefore, the aim of this study was to determine the interobserver agreement in the assignment of the cytological grading parameters and overall grade.

Material and methods

✓ Sample



- MCTs samples were routinely stained with Hemacolor (Merck)

✓ Cytologic grading method

- MCTs samples were graded by three observers (JM, MS, RM), according to the algorithm¹ represented in Fig. 7.

- Granularity was scored as: abundant, poor or mixed.

- Nuclear pleomorphism was considered present if non-rounded nuclear shapes existed, or absent if only round to ovoid shapes were noted.

- Mitotic figures and the presence of bi/multinucleated cells were scored as present or absent.

- Anisokaryosis was defined as > 50% variation in nuclear size.

✓ Statistical analysis

- The interobserver agreement was computed by the kappa statistics² (weighted, K_w or unweighted, K_u) and by the intraclass correlation coefficient (ICC).

Interpretation of k values:³

- $k > 0.8$ = perfect agreement;
- $0.6 < k \leq 0.8$ = good agreement;
- $0.4 < k \leq 0.6$ = moderate agreement;
- $k < 0.4$ = low agreement.

Interpretation of ICC values:⁴

- ICC > 0.9 = excellent reliability;
- $0.75 < \text{ICC} < 0.9$ = good reliability;
- $0.5 < \text{ICC} < 0.75$ = moderate reliability;
- < 0.5 = poor reliability.

- $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Table 1: Interobserver agreement: kappa statistics (K_w , kappa weighted, K_u , kappa unweighted)

	Granularity	Mitotic Figures	Nuclear Pleomorphism	Bi/multinucleation	Anisokaryosis	GRADE
Observer 1 versus Observer 2	K_u 0.39 (0.17; 0.62) $P=0.0002$	0.76 (0.51; 1) $P=0.0007$	0.36 (0.071; 0.64) $P=0.02$	0.43 (0.15; 0.71) $P=0.007$	0.43 (0.15; 0.71) $P=0.007$	0.61 (0.38; 0.84) $P<0.0001$
	K_w 0.63 (0.47; 0.78)	-	-	-	-	-
Observer 1 versus Observer 3	K_u 0.51 (0.29; 0.72) $P=0.0001$	Not assessed: observer 3 did not observed mitotic figures	0.21 (-0.1; 0.52) $P=0.1488$	0.03 (-0.25; 0.31) $P=0.421$	0.40 (0.11; 0.69) $P=0.0038$	0.22 (-0.062; 0.5) $P=0.071$
	K_w 0.67 (0.51; 0.84)	-	-	-	-	-
Observer 2 versus Observer 3	K_u 0.45 (0.23; 0.67) $P=0.0001$	Not assessed: observer 3 did not observed mitotic figures	0.38 (0.06; 0.67) $P=0.0227$	0.36 (-0.02; 0.73) $P=0.054$	0.47 (0.19; 0.75) $P=0.0042$	0.43 (0.17; 0.69) $P=0.002$
	K_w 0.45 (0.49; 0.80)	-	-	-	-	-

Color legend: yellow = good agreement; orange = moderate agreement; red = low agreement

Table 2: Interobserver agreement: intraclass correlation coefficient (ICC)

	Granularity	Mitotic Figures	Nuclear Pleomorphism	Bi/multinucleation	Anisokaryosis	GRADE
Observers 1, 2 e 3	0.85 (0.76; 0.91) $P<0.0001$	0.62 (0.38; 0.78) $P<0.0001$	0.59 (0.34; 0.76) $P<0.0001$	0.48 (0.16; 0.69) $P<0.004$	0.70 (0.51; 0.82) $P<0.0001$	0.69 (0.49; 0.82) $P<0.0001$

Color legend: yellow = good reliability; orange = moderate reliability; red = poor reliability

- Regarding to the cytological grade, kappa values ranged from 0.22-0.61 while the ICC was 0.69, indicating a low to moderate agreement.

- Higher agreement was obtained for the evaluation of granularity and mitotic figures (but only between observers 1 and 2), while the presence of bi/multinucleated cells and nuclear pleomorphism were the less reproducible parameters.

Discussion

- In general, the interobserver reproducibility of the cytological grade of MCTs was moderate. This partially contrasts with the original publication of the cytological grade method, which described a good consistency among observers.¹

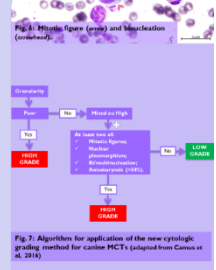
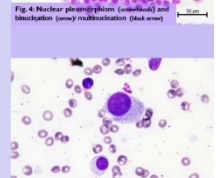
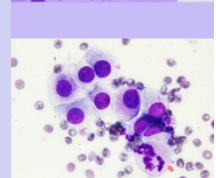
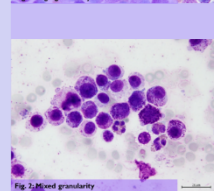
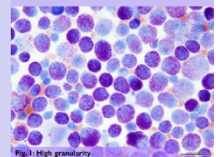
- The lack of agreement in the overall cytological grade can be justified by the difficulty in assessing some of the grading parameters, which were less objective, such as nuclear pleomorphism and multinucleation.

- The low reproducibility of some of the grading parameters justifies training sessions and studies with a large panel of observers.

- The impact of the level of reproducibility of the cytologic grading method in clinical decisions deserves further studies.

References

- Correa MS, Fries H, Kessler JM, Ostrick EA, Balch PM, Ito H, Krimer PM (2016) "Cytologic Criteria for Mast Cell Tumor Grading in Dogs With Evaluation of Clinical Outcome" *Veterinary Pathology* 1-7.
- Santos M, Correia-Gomes C, Santos A, Dias-Pereira A, Lopes C (2015) "Interobserver Reproducibility of Histological Grading of Canine Simple Hemerythrin Carcinoma" *Journal of Comparative Pathology* 153,22-27.
- Viera AJ, Garrett JM (2015) "Understanding Interobserver Agreement: The Kappa Statistic" *Family Medicine* 37,340-343.
- Koo TK, Li MY (2016) "A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research" *Journal of Chiropractic Medicine* 15,155-163.

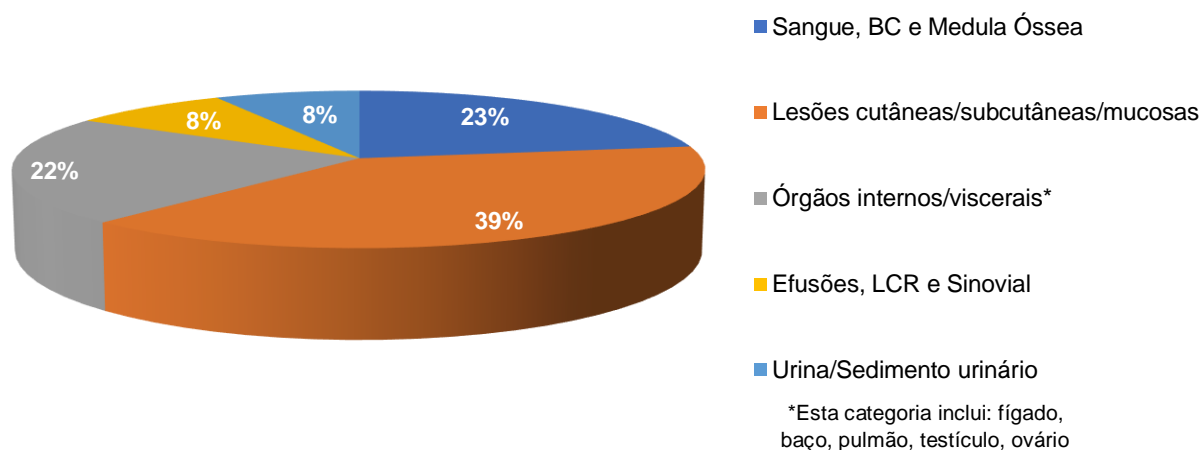


ANEXO III – Casuística dos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS-UP

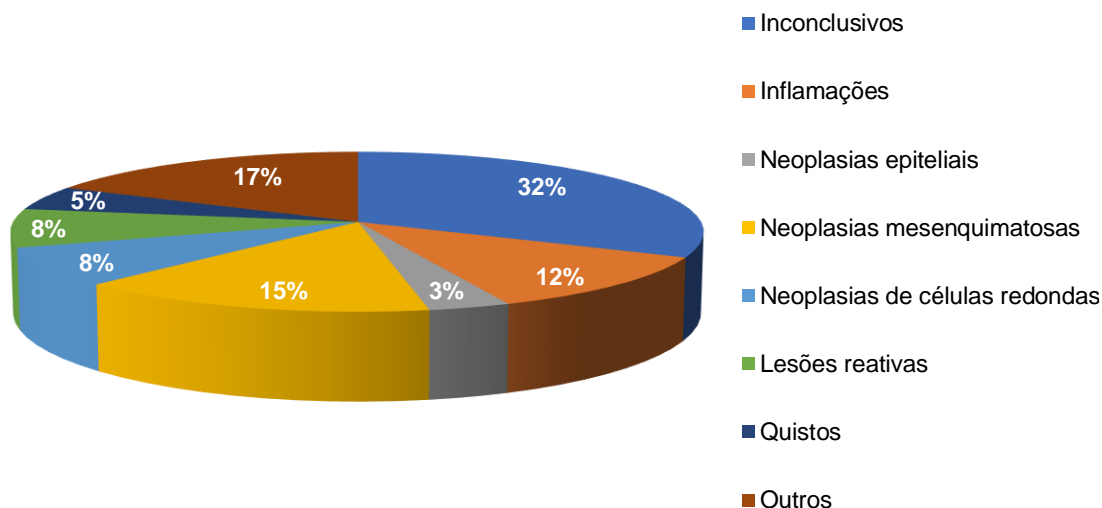
(relativa ao período compreendido entre 2 de janeiro de 2017 e 28 de abril de 2017)

Durante o estágio curricular nos Serviços de Citologia Veterinária, no Laboratório de Histologia e Embriologia do ICBAS-UP, acompanhei a rotina de diagnóstico citológico. As amostras citológicas eram oriundas do Hospital Veterinário do ICBAS: UP-Vet. Nos 4 meses de estágio observei 335 casos citológicos: 67% foram casos da rotina e 33% foram casos do arquivo.

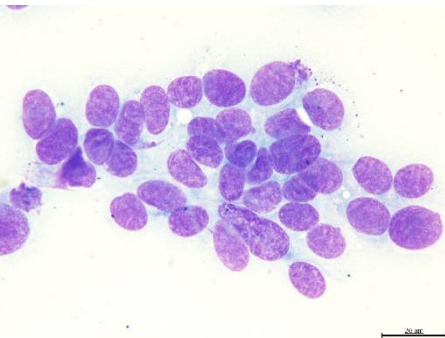
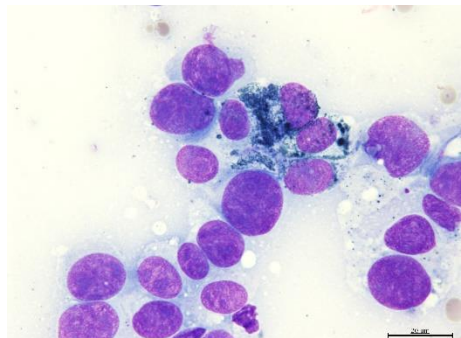
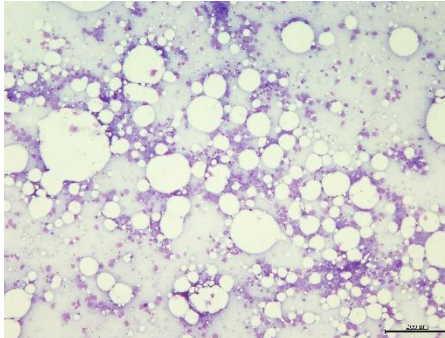
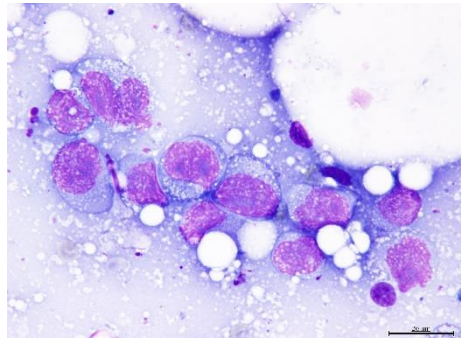
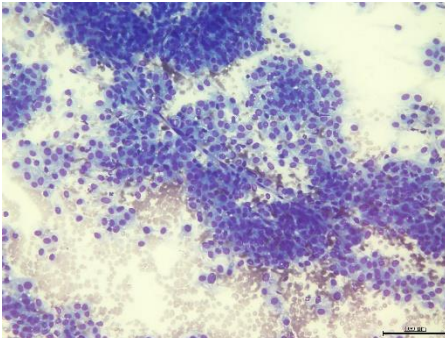
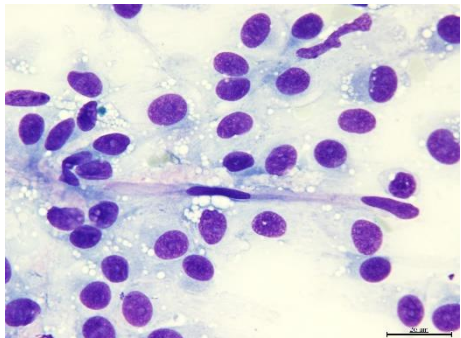
**Casuística dos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS-UP:
casos da rotina - origem das amostras**



**Casuística dos Serviços de Citologia Veterinária do ICBAS-UP:
casos da rotina - diagnóstico**



Exemplos de casos citológicos observados durante o período de estágio

<p>Caracterização do caso: Cão, Rottweiler, fêmea, 16 anos</p> <p>Amostra: punção aspirativa de nódulo cutâneo digital</p> <p>Descrição: população de células neoplásicas pleomórficas, isoladas e em grupos, com marcada anisocitose e anisocariose e muito ocasionalmente com grânulos de melanina.</p> <p>Achados citológicos compatíveis com: <u>melanoma amelanótico</u></p>		
<p>Caracterização do caso: Cão, Boxer, macho, 12 anos</p> <p>Amostra: punção aspirativa de nódulos cutâneos múltiplos</p> <p>Descrição: População de células linfoides de grandes dimensões, com citoplasma microvacuolizado e com marcada atipia nuclear e nucleolar</p> <p>Achados citológicos compatíveis com: <u>linfoma cutâneo</u></p>		
<p>Caracterização do caso: Cão, Husky, fêmea, 13 anos</p> <p>Amostra: punção aspirativa de nódulo subcutâneo</p> <p>Descrição: população de células mesenquimatosas fusiformes a estreladas, associadas a estruturas vasculares</p> <p>Achados citológicos compatíveis com: <u>tumor das bainhas perivasculares/hemangiopericitoma</u></p>		
<p>Caracterização do caso: Cão, raça indeterminada, macho, 12 anos</p> <p>Amostra: punção aspirativa de nódulo testicular</p> <p>Descrição: população de células epiteliais microvacuolizadas, dispostas em monocamada e associadas a estruturas vasculares.</p> <p>Achados citológicos compatíveis com: <u>tumor das células intersticiais/Leydig</u></p>	